



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“ALTERACIONES EN EL METABOLISMO DE
CARBONO DURANTE PRIMING NATURAL DE
SEMILLAS DE *OPUNTIA TOMENTOSA*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

JORGE LUIS RAMÍREZ SÓSTENES.



MÉXICO, D. F.

2008.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. JESUS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE.
VOCAL: DRA. SOBEIDA SANCHEZ NIETO
SECRETARIO: M en C. RAQUEL ORTEGA MUÑOZ
1ER. SUPLENTE: DRA. GLORIA GUTIERREZ VENEGAS
2º SUPLENTE: DR. JOSE IGNACIO PARAMO RAMÍREZ

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO 114 DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, CONJUNTO E DE LA FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNAM, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO

DRA. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO
ASESOR

JORGE LUIS RAMÍREZ SÓSTENES
SUSTENTANTE

DEDICATORIAS

Esta tesis fue lograda gracias al apoyo de varias personas muy importantes en mi vida que me han dado su amor y que por siempre vivirán en mi recuerdo.

A LA MEMORIA DE:

† Mi tío Gerardo Ramírez Hernández.

Que se nos adelanto en el camino pero que su recuerdo
vivirá en mi mente y en mi corazón.

Agradezco a mis padres.

Por todo el amor, cariño y apoyo incondicional que me han brindado durante todo este tiempo, por ayudarme a ser lo que soy, los amo, los respeto y los admiro.

A mis dos queridos hermanos, Pablo y Miguel.

Por todo el tiempo que hemos compartido, por el amor que nos damos, pero sobre todo por la unión que tenemos, de ustedes eh aprendido muchísimo, probablemente mi carácter fuerte y arrebatado lo obtuve de Miguel, lo bondadoso, sencillo y ocurrente me lo enseñaste tu Pablo. Gracias hermanos los quiero mucho y espero que por el resto de nuestras vidas siempre estemos juntos, apoyándonos en cada momento, porque sé, que mientras estemos juntos como familia seremos capaces de todo.

A Eduardo, Edith y a sus hijos, Lalito y Alex.

Los quiero mucho igual que el resto de mi familia, sin ustedes no seria lo mismo, gracias por todos los consejos que me han dado, las noches de estudio siempre fueron mas llevaderas después de la sobremesa de una cena en mi casa con ustedes, gracias Edith por todas las ocurrencias que te inventas que me causan tanta risa,

gracias Eduardo por todas las noches interminables de play, pero sobre todo gracias por dejarme convivir con sus hermosos hijo, mis niños Lalito y Alex los quiero mucho.

A mi asesora, La Dra. Sobeida.

Gracias por todo el apoyo que me brindó en esta aventura llamada tesis, por la confianza que deposito en mi, por enseñarme cada día que uno puede lograr las cosas que se proponga, no importa que tan grandes sean. Por todo el amor y cariño que me dio durante mi estancia en el laboratorio. Con usted comprendí el verdadero significado de la palabra maestro

A mis amigos.

A mi amigo del alma Raúl, a quien le agradezco todo el tiempo que me ha dedicado, por escucharme y darme valiosos consejos, porque sin querer encontré en él un verdadero amigo.

A Mony que siempre estuvo en los peores momentos para apoyarme y darme una sonrisa, porque a tú lado es un aprendizaje continuo, por transmitirme ese optimismo inquebrantable y por todo el amor que me das, te quiero mucho.

A Silvia, gracias por todo tu apoyo que me has brindado desde el primer día que llegue al laboratorio, por esas palabras de ánimo que me das cuando más las necesito, pero sobre todo por todo ese amor que me das día a día que nunca podré pagártelo.

A Roy, Pive, Kary, Eric, Ernesto, Rox, Bele, Karen, Jess, Paloma, Luis, gracias por cruzarse en mi camino y por dejarme ser parte de su vida.

A mis amigos del laboratorio, Aida, Pablo, Arturo, Gaby, Alejandra, al tocayo, pilo, alfred, tavo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco la beca recibida por parte del proyecto CONACYT 47859-Q, para la realización de mi tesis.

El presente trabajo fue financiado parcialmente por el proyecto CONACYT 47859-Q y por la Facultad de Química de la UNAM, PAIP 6290-12.

Se agradece a la Dra. Alma Orozco su apertura para contribuir con la presente tesis en el conocimiento sobre el efecto del priming natural en la movilización de reservas de carbono en las semillas de *Opuntia tomentosa*.

Se agradece al grupo de la Dra. Orozco quienes nos proporcionaron muy amablemente semillas para la realización del trabajo.

Se agradece a la M. en C. Lilián Valencia Turquotte, por su asesoría técnica en la separación y determinación de lípidos por cromatografía en capa fina.

Se agradece a la M. en C. Beatriz King Díaz, por su asesoría técnica en el uso del oxímetro y en la determinación de la capacidad respiratoria de las semillas.

Se agradece a la QFB. María Consuelo Enríquez Arredondo, por su apoyo técnico durante el presente trabajo.

ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN.....	10
INTRODUCCIÓN.....	11
I. Opuntia tomentosa.....	11
II. Germinación.....	13
III. Priming.....	17
IV. Movilización de reservas de carbono durante las distintas fases de germinación.....	19
JUSTIFICACIÓN.....	24
HIPOTESIS.....	25
OBJETIVOS.....	26
Objetivo general.....	26
Objetivos particulares.....	26
MATERIALES Y METODOS.....	27
Material Biológico.....	27
Germinación.....	27
Ensayo de respiración de semillas (consumo de oxígeno).....	27
Extracción de carbohidratos solubles: glucosa, fructosa y sacarosa.....	28
Cuantificación de azúcares solubles: glucosa, fructosa y sacarosa.....	28
Cuantificación de almidón:.....	29
Cuantificación de Lípidos.....	30
Análisis de lípidos por cromatografía en capa fina.....	30
Detección in situ de actividad enzimática en semillas o embriones de O. tomentosa.....	33
Detección de actividades enzimáticas.....	34
Análisis estadístico.....	35
RESULTADOS.....	36
Efecto del priming natural en el perfil germinativo de semillas O. tomentosa.....	36
Efecto del priming natural en la toma de oxígeno de las semillas de O. tomentosa.....	37
El “priming” natural acelera la movilización de carbono en semillas de O. tomentosa.....	38
Efecto del “priming” natural en enzimas claves del metabolismo de carbono de semillas de O. tomentosa.....	50
Detección in situ de la actividad de las invertasas ácidas y la Malato sintasa “in situ” en embriones de O. tomentosa.....	51
Detección de la actividad de la malato sintasa en embriones sin embeber de O. tomentosa sometida a dos diferentes tratamientos de priming natural.....	59
Detección de la actividad de la malato sintasa en embriones embebidos de O. tomentosa sometida a dos diferentes tratamientos de priming natural.....	66
Actividad en la zona de la Cotiledones.....	71
DISCUSIÓN.....	72
Efecto del priming natural cerrado en el metabolismo de carbono de las semillas de Opuntia tomentosa.....	77
CONCLUSIONES.....	79
PERSPECTIVAS.....	80
REFERENCIAS.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curva de toma de agua por las semillas.....	15
Figura 2. Interconversión de lípidos en carbohidratos	21
Figura 3. Hidrólisis de los granos de almidón en granos de cereales por amilosis.....	23
Figura 4. Curva estándar de fosfatidilcolina (PC) obtenida mediante TLC.....	31
Figura 5. Curva estándar de fosfatidiletanolamina (PE) obtenida mediante TLC.....	31
Figura 6. Curva estándar de ácido oleico (O.A) obtenida mediante TLC.....	32
Figura 7. Curva estándar de Diacilglicerol (DGA) obtenida mediante TLC.....	32
Figura 8. Curva estándar de ácido oleico (TAG) obtenida mediante TLC.....	33
Figura 9. Reacción de reducción del NBT por protones.....	34
Figura 10. Curva de germinación de semillas de <i>O. tomentosa</i> que fueron sometidas a dos diferentes tratamientos de priming natural.....	36
Figura 11. Comparación del consumo de oxígeno de los tres lotes de semillas de <i>O. tomentosa</i> a dos tiempos de germinación.....	37
Figura 12. Morfología comparada de los embriones de semillas de <i>O. tomentosa</i> sometidas al priming natural.....	38
Figura 13. Contenido de glucosa en semillas de <i>O tomentosa</i> sometidas a priming natural cerrado y abierto.....	39
Figura 14. Contenido de fructosa en semillas de <i>O tomentosa</i> sometidas a priming natural cerrado y abierto.....	40
Figura 15. Contenido de sacarosa en semillas de <i>O tomentosa</i> sometidas a priming natural cerrado y abierto.....	41
Figura 16. Contenido de almidón en semillas de <i>O tomentosa</i> sometidas a priming natural cerrado y abierto.....	42
Figura 17. Contenido lípidos a 0 y 4 h de germinación de las semillas de <i>O. tomentosa</i> sometidas a dos diferentes tratamientos de priming natural.....	43
Figura 18. Determinación de ácidos grasos y fosfolípidos en extractos lipídicos obtenidos de los tres lotes de semillas de <i>O. tomentosa</i> germinadas 0 y 4 h.....	45
Figura 19. Contenidos de TAG, AO y DAG de las semillas secas y germinadas 4 h de <i>O. tomentosa</i> sometidas a dos diferentes tratamientos de priming natural.....	46
Figura 20. Contenidos Fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina de semillas secas y germinadas 4 h de <i>O.</i> <i>tomentosa</i> sometidas a dos diferentes tratamientos de priming natural.....	47
Figura 21. Contenido acumulado de los 5 lípidos detectados en las semillas de <i>Opuntia tomentosa</i> sometidas a dos tratamientos de priming natural.....	49
Figura 22. Embrión de <i>Opuntia tomentosa</i>	52
Figura 23. Detección <i>in situ</i> de la actividad de las Inv en los embriones de lote control de <i>O. tomentosa</i> ...53	53
Figura 24. Detección <i>in situ</i> de la actividad de las Inv en los embriones de lote abierto de <i>O. tomentosa</i> ...55	55
Figura 25. Detección <i>in situ</i> de la actividad de las Inv en los embriones de lote cerrado de <i>O. tomentosa</i> ...56	56
Figura 26. Curso temporal de actividad de las Inv. en los tres lotes de semillas de <i>O. tomentosa</i> , control, cerrado y abierto.....	58

Figura 27. Detección *in situ* de la actividad de la MS en embriones de *Opuntia tomentosa* lote control..... 60

Figura 28. Detección *in situ* de la actividad de la MS en embriones de *Opuntia tomentosa* lote abierto. 62

Figura 29. Detección *in situ* de la actividad de la MS en embriones de *Opuntia tomentosa* lote cerrado. ... 63

Figura 30. Curvas temporales de actividad de MS de embriones sin embeber provenientes de semillas de *O. tomentosa* sometidas a priming natural. 65

Figura 31. Detección *in situ* de la actividad de la MS en embriones de *Opuntia tomentosa* lote control 4h. 67

Figura 32. Detección *in situ* de la actividad de la MS en embriones de *Opuntia tomentosa* lote abierto 4h 68

Figura 33. Detección *in situ* de la actividad de la MS en embriones de *Opuntia tomentosa* lote cerrado 4h 69

Figura 34. Curva temporal de actividad de MS de los embriones *O. tomentosa* embebidos 4h. 70

ABREVIATURAS

ABA	Ácido Abscísico
ATP	Adenosin Trifosfato
CoA	Coenzima A
EDTA	Ácido etilendiamina tetraacético
DAG	Diacilglicerol
G6PDH	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
INV	Invertasa ácida
MS	Malato sintasa
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADP ⁺	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NBT	Azul de nitrotetrazolio
OA	Ácido oleico
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatdiletanolamina
PGI	Fosfoglucosa isomerasa
PVP 40	Polivinilpirrolidona-40
TAG	Triacilglicerol
TLC	Cromatografía en capa fina

RESUMEN

El priming natural consiste en la hidratación-deshidratación de las semillas que ocurre bajo las condiciones cambiantes del ambiente, periodos de alta humedad, seguidos o interrumpidos por periodos de sequía, lo que favorece que la semilla comience la germinación pero que no la concluya. En el priming, la hidratación inicia los procesos bioquímicos y metabólicos de la semilla propios de la germinación y que permanecen en su memoria aún cuando después se seque la semilla. En el siguiente periodo de lluvias la semilla utiliza la información bioquímica y fisiológica almacenada para continuar la germinación y favorecer su establecimiento como plántula. Se sabe que el priming natural sincroniza y adelanta la germinación, así como también mejora la supervivencia de la planta bajo condiciones adversas de crecimiento.

En este trabajo se estudiaron algunos de los eventos moleculares que ocurren durante el priming natural, poniendo énfasis en la movilización de las reservas de carbono de la semilla de *Opuntia tomentosa*. El objetivo fue determinar si en las semillas de *Opuntia tomentosa* que pasaron por dos tratamientos de priming natural, habrían ocurrido cambios en el metabolismo que pudieran asociarse a la capacidad mejorada de resistir al estrés ambiental.

Las semillas fueron sometidas a dos distintos tipos de priming natural, cerrado y abierto. Se determinaron algunos metabolitos fuente de carbono tanto a 0 como a 4 h de germinación y las actividades metabólicas de dos enzimas importantes en su movilización: las invertasas y la malato sintasa. Las actividades enzimáticas se determinaron *in situ* en los embriones extraídos de la semilla, mediante ensayos acoplados a la producción de NADH o NADPH y la posterior reducción del azul de tetrazolio. Se tomaron las fotos de los embriones y se obtuvieron las densitometrías y con esto la actividad.

Encontramos actividad respiratoria en las semillas que fueron sometidas al tratamiento de priming al tiempo 0 h de alrededor de $15 \mu\text{atomo}$ s de $\text{O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ semilla}^{-1}$, contrario a las semillas control que no presentaron actividad respiratoria, lo que indica que el proceso germinativo se inicio durante el periodo de priming. Al extraer los embriones se encontró que a las 0 h ya hay crecimiento radicular y que en 4 h la raíz de las semillas con priming alcanzan el tamaño del embrión, mientras que en las control a las 4 h apenas han crecido un 20% respecto al tiempo 0. La concentración de almidón, fructosa y triacilglicerol fue menor en las semillas secas que fueron sometidas al priming, pero no hubo cambio en el contenido de la sacarosa, glucosa y los lípidos totales. La actividad de las invertasas ácidas aumentan de 0 a 4 h de germinación, sin embargo el contenido de sacarosa no disminuye sino aumenta. Otra observación más fue que el contenido de lípidos a las 4 h es muy diferente para los tres lotes examinados. Analizando algunos lípidos encontramos que el patrón de lípidos que encontramos a las 4 h, era explicado por el contenido de DAG, disminuye su contenido en el control, aumenta en el priming abierto y no hay cambio en el priming en cerrado. Para explicar los cambios encontrados tanto en lípidos, fructosa y sacarosa, medimos la actividad de la malato sintasa. La MS de los embriones sometidos al priming se encontraba activa y aumentada tanto a las 0 como a las 4 h de germinación. La mayor actividad tanto de las Inv como de la MS, sugiere que el metabolismo de la sacarosa se encuentra adelantado en ambos tipos de priming, sin embargo el priming que se realizo en la zona abierta parece favorecer a las enzimas determinadas, ya que su actividad es mayor que la que hay en los embriones con priming en cerrado. Lo anterior podría sugerir que la estancia de la semilla a condiciones extremas de alta temperatura o baja humedad como es el caso del enterramiento en abierto, favorece mecanismos que hacen que la semilla probablemente repare sus

membranas –lo que explica en parte la disminución de TGA y el aumento en los fosfolípidos- o se encuentre en un proceso más adelantado en la producción de sacarosa para favorecer el crecimiento y establecimiento de la plántula en desarrollo.

INTRODUCCIÓN.

I. Opuntia tomentosa.

El género **Opuntia**, de la familia de las cactáceas, consta de más de 300 especies todas oriundas del continente americano desde el norte de Estados Unidos hasta la Patagonia, donde viven silvestres. Fueron introducidas en Europa por los conquistadores y se naturalizaron fácilmente en la región mediterránea. La especie tipo es la *Opuntia ficus-indica*, conocida como **nopal** en México o **Tuna** y **chumbera** en España. Sus frutos comestibles, las tunas o higos chumbos, son muy populares en México, Andalucía y el Levante español (de los que incluso se fabrica helado).

Todas las opuntias se caracterizan por ser muy ramificadas, con ramas muy extendidas o sus segmentos son característicos del género, con apariencia de hoja carnosa, planos y generalmente ovales, poseen la capacidad de convertirse en tallos y a su vez emitir nuevos segmentos y flores (Hans-Walter, 1999).

Opuntia tomentosa (Rambla de Castro. Tenerife)

Reino.	<i>Plantae</i> – planta
Subreino.	<i>Tracheobionta</i> – plantas vasculares
Super división.	<i>Spermatophyta</i> – plantas de la semilla
División.	<i>Magnoliophyta</i> – Plantas florecientes
Clase.	<i>Magnoliopsida</i> – Dicotiledóneas
Subclase.	<i>Caryophyllidae</i> –
Orden.	<i>Caryophyllales</i> –
Familia.	<i>Cactaceae</i> – Familia cacto
Genero.	<i>Opuntia</i> – nopal
Especie.	<i>Opuntia tomentosa</i>

Es conocida también como *Opuntia oblongata*, *Opuntia macdougaliana*, *Opuntia sarca*, *Opuntia velutina* var. *macdougaliana*, *Opuntia tomentosa* var. *hernandezii*, *Opuntia hernandezii*, *Opuntia icterica*.

Importancia económica y alimenticia de Opuntia.

El uso de *Opuntia* se realiza en México desde épocas prehispánicas, donde jugaron un importante papel en la economía agrícola del imperio Azteca. El maíz (*Zea mays*), el agave (*Agave* spp.) y el nopal (*Opuntia*) son las plantas cultivadas más antiguas de México (Stephen *et al.*, 2003).

El nopal es ahora parte del paisaje natural y de los sistemas agrícolas de muchas regiones del mundo. Típicamente, existen tres sistemas principales de producción: comunidades de cactus silvestre, huertas familiares, y plantaciones comerciales intensivas. Las *Opuntias* se han adaptado perfectamente a zonas áridas caracterizadas por condiciones secas, lluvia errática y suelos pobres expuestos a la erosión. Funcionando como cosechas vitales en casos de sequía extrema para la alimentación tanto de humanos (el nopal y su fruto) como en animales (forraje). (Stephen *et al.*, 2003).

En años recientes, hay un creciente interés por *Opuntia*, con énfasis en *O. ficus-indica*, y en el importante papel que desempeñan en sistemas agrícolas áridos y semiáridos, donde agricultores y ganaderos deben concentrarse en aquellas especies que pueden no solo sobrevivir en estos climas, si no que sean económicamente activas. Así, *Opuntia*, se ha convertido en un recurso inagotable de productos y usos, inicialmente como planta silvestre, y después, como cultivo de subsistencia y comercial; contribuyendo a la seguridad alimenticia de poblaciones en áreas agrícolas marginadas (Reynolds y Arias, 2003).

Importancia ambiental de Opuntia

Opuntia spp. está siendo utilizada en programas para prevenir la erosión del suelo y combatir la desertificación, ya que tiene una gran capacidad de adaptación en tierras pobres, inapropiadas para otro tipo de cultivos, debido a que las distintas especies pueden sobrevivir y extenderse bajo condiciones de lluvia escasa y errática, así como altas temperaturas, y desempeñan también un importante papel en la protección de la fauna local. (Stephen *et al.*, 2003).

Opuntia es un valioso recurso natural y económico, que no es aprovechado al máximo en muchos países, pero que puede proveer de forraje a ganado, de sustento alimentario, y en últimos años se han descubierto propiedades fisicoquímicas de su mucílago para la obtención de polímeros que ayudaran en un futuro al sector industrial.

II. Germinación.

La germinación empieza con la toma de agua por la semilla (imbibición), la muestra visible que ha concluido es la salida de la radícula, el precursor de la raíz, a través de la capa de la semilla. La germinación de la semilla es la transición del embrión quieto, que se ha convertido del óvulo fertilizado, en una nueva planta fotosintéticamente activa. En el proceso se suceden una serie de eventos, por ejemplo, la hidratación de las macromoléculas, cambios a nivel estructural, en la respiración, la síntesis de macromoléculas y el crecimiento celular, aunque ninguno de estos eventos por si solo constituye la germinación. Así, transforman a un embrión deshidratado con un metabolismo lento y casi indetectable en un metabolismo vigoroso que culmina en el crecimiento. La germinación en un sentido estricto no incluye el crecimiento de la plántula, el cual comienza cuando la germinación termina (Bewley y Black, 1994).

El contenido de humedad en las semillas inicialmente es muy bajo, alrededor de 5-15%, al igual que la actividad metabólica y para que ocurra la germinación las

semillas necesitan ser hidratadas bajo condiciones adecuadas de temperatura y oxígeno (Bove *et al.*, 2001). La toma de agua por las semillas es un proceso que se presenta en tres fases (Figura 1) y delimita los cambios que ocurren durante el proceso germinativo. Sólo las dos primeras fases son consideradas germinativas y la tercera como una fase post-germinativa. (Bove *et al.*, 2001; Bradford, 2004).

A continuación se describe cada una de las fases de toma de agua por la semilla:

Fase I. La toma inicial de agua por la semilla, denominada imbibición, se considera ser un iniciador de la germinación y los procesos metabólicos que ocurren consecuentemente. Debido a que el contenido de humedad de la semilla es bajo, la toma de agua por la semilla es rápida y totalmente independiente de si el tejido es viable o no, es decir es sólo un proceso físico que no depende de la capacidad metabólica de la semilla. El proceso de imbibición le permite a la semilla reasumir la actividad metabólica como la respiración, la síntesis de proteínas, la reparación del DNA y de las membranas celular, entre otros. Los sustratos metabólicos de éstas actividades inicialmente son los que se encuentran en la célula del embrión o en el tejido cercano a este.

Adicionalmente, las semillas no solamente restablecen su actividad metabólica durante la hidratación sino también se activa la maquinaria necesaria para recibir y transducir las señales ambientales como de intensidad luminosa, temperatura, presencia de patógenos. Así debe existir una comunicación entre los tejidos en desarrollo y el medio que lo rodea (Bove *et al.*, 2001; Bradford, 2004).

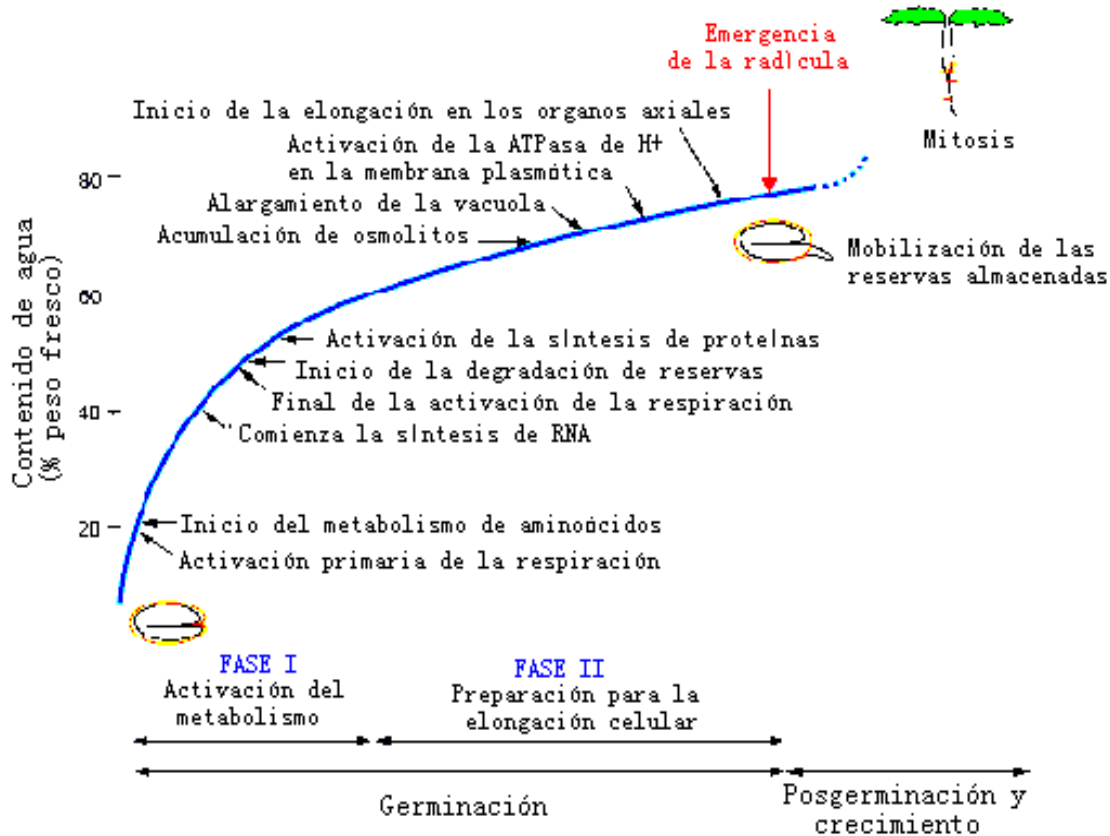


Figura 1. Curva de toma de agua por las semillas. Se indican las tres fases que componen la germinación (Adaptado de Bove *et al.*, 2001).

Fase II. También denominada fase estacionaria. Se presenta una extensa transformación metabólica a pesar de que no se observa un aumento en la absorción de agua, debido principalmente a que el nivel de la hidratación excede del 60 %. Los procesos bioquímicos y fisiológicos se preparan para la extensión de la célula en las zonas embrionarias, para culminar con el alargamiento de la célula. La mayor actividad metabólica ocurre durante la fase II, ya que prepara a las células para la división celular y la posterior diferenciación, hay un aumento importante en los niveles de ATP y la pérdida de inhibidores germinativos como es el ácido abscísico (ABA). ABA se encuentra relacionado con el potencial de agua de la célula, ya que al ser mayor el $\Delta\psi$ (potencial hídrico) disminuye el efecto inhibitorio de ABA (Bove *et al.*, 2001, y Srivastava, 2002). Las sustancias activas tales como azúcares, aminoácidos y los iones potasio se acumulan osmóticamente en el interior celular, por tanto la acidificación de la pared de célula

es alta. La acidificación del apoplasto conduce a un debilitamiento de los enlaces entre los polímeros de la pared celular y facilitan su elongación. Estos acontecimientos coinciden con la activación del ATPasa de H⁺, que da lugar a un aumento posterior en la toma de agua que puede coincidir con el debilitamiento de los tejidos finos circundantes (el endospermo) mientras que las zonas embrionarias se alargan, llevando a la conclusión de la germinación (Bradford, 2004).

Fase III. Fase post-germinativa que se caracteriza por presentar un incremento considerable en la absorción de agua y en la actividad respiratoria, debido a la aparición de las nuevas estructuras de la joven plántula, tallo y raíces que son muy evidentes.

El material de reserva almacenado en forma de lípidos, proteínas y/o almidón, localizado en los cotiledones y/o el endospermo del embrión, se movilizará antes de que termine la germinación y se utilizarán en los pasos posteriores a la germinación para sostener a la planta joven en sus etapas tempranas de crecimiento y antes de que llegue a ser autótrofa. Si el ciclo de la célula se activa durante la germinación, la primera división de la célula (mitosis) ocurrirá en la fase post-germinativa (Bove *et al.*, 2001).

Latencia

Los requerimientos germinativos varían en todas las especies y están determinados por factores internos como son la madurez y viabilidad de la semilla, así como el contenido de hormonas. Aunque también se ve influenciada por factores externos como son el agua, el oxígeno, el CO₂, la temperatura y la luz y algunas sustancias químicas como nitratos (Srivastava, 2002)

Algunas semillas pese a que haya condiciones adecuadas de humedad, luz y temperatura, no germinan, en ellas se presenta un fenómeno conocido como latencia. La latencia es un periodo en el cual se presenta una interrupción del

desarrollo debido a un bloqueo químico, fisiológico o estructural que impide la germinación.

La latencia de una semilla se divide principalmente en dos tipos: la latencia primaria, que se adquiere durante la maduración de la semilla y la latencia secundaria, la cual es el resultado de factores que atacan a la semilla después de su maduración, es decir factores que puede presentar el medio ambiente y que son subóptimas de la germinación.

La latencia primaria puede darse por muchas razones, en algunas semillas la estructura que rodea al embrión (testa) evita que el embrión germine. Si la barrera se quita mecánicamente el embrión puede emerger. En otras semillas la testa no tiene ningún efecto, y la inactividad o poca actividad germinativa es inherente al embrión. Generalmente, la latencia relacionada al embrión se pierde después de percibir señales ambientales como temperaturas frías o exposición a la luz (Srivastava, 2002). Otras semillas presentan latencia porque el embrión es inmaduro y la entrada de agua a la semilla conducirá a continuar el proceso de maduración y posteriormente el embrión podrá crecer a temperaturas adecuadas.

III. Priming.

Después de la dispersión de la semilla de la planta madre, las semillas de las plantas con flores caen o se dispersan. El estadio posterior de la semilla es la germinación. Durante la germinación la semilla absorbe agua, reanuda el crecimiento y su raíz primaria sale. Sin embargo, las plantas generalmente ajustan sus patrones de crecimiento en respuesta a los ritmos ambientales y a circunstancias ambientales únicas. La germinación también es un proceso que responde a esos patrones. Usualmente, la disponibilidad de agua es estacional y la germinación coincide con el regreso de las lluvias en la primavera. El proceso de imbibición comenzará en el periodo de lluvias, sin embargo no siempre llevará a que la germinación concluya, ya que dependerá de la intensidad y el periodo de éstas (González-Zertuche 2001).

En el laboratorio se ha tratado de reproducir lo que la naturaleza hace, es así como se han diseñado experimentos de acondicionamiento o de hidratación-deshidratación, también denominados de “priming” en los que se colocan semillas en condiciones que les permita iniciar la germinación, controlando la cantidad de agua que entra o mantiene la semilla, pero sin dejar que la germinación ocurra y posteriormente se somete el lote a un periodo de secado. La razón de controlar el contenido de agua en un lote de semillas, radica en sincronizar al lote en los procesos bioquímicos y fisiológicos relacionados con la germinación, la tolerancia al estrés y la auto-reparación enzimática de las membranas celulares. Posteriormente, cuando vuelva a darse inicio a la germinación, todas las semillas germinaran casi simultáneamente (sincronizadas) y más rápidamente.

Debido a que los eventos bioquímicos y fisiológicos que ocurren durante el priming, tienden a ser almacenados en forma fisiológica se le ha denominado a esta forma de almacenar “**memoria hídrica**”. Entonces la memoria hídrica de una semilla se refiere a la habilidad que tienen las semillas de retener durante varios periodos de deshidratación los cambios inducidos por o como resultado de la hidratación de la semilla (Dubrosky, 1996).

El priming de laboratorio ha permitido mantener lotes de semillas almacenadas por periodos largos, o bien recuperar la viabilidad y longevidad, además de eliminar el periodo de latencia, lo que permite incrementar los rendimientos y el establecimiento de las plántulas bajo condiciones ambientales adversas (Dubrosky, 1996).

Sin embargo, en el priming de laboratorio se controlan no sólo la cantidad de agua que entra a la semilla, sino también la temperatura, el foto-periodo y el tipo de sustrato usado para la germinación, además de controlar la velocidad de pérdida de agua. Todos ellos factores que en la naturaleza cambian no sólo de un día a otro, sino durante el día. Existen semillas que generalmente no germinan en el

primer año de caída de lluvias sino hasta el siguiente, mecanismo complejo, aún poco entendido pero que permite a las plantas sobrevivir a condiciones adversas y perpetuar a la especie.

En los desiertos de Norteamérica como el de Sonora, se llevan a cabo patrones de precipitación en dos estaciones, sin embargo la duración del periodo de lluvias, la cantidad y tiempo de precipitación es impredecible. Algunas semillas de cactáceas requieren para iniciar la germinación entre 24 h como en *Pachycereus pringlei* o algunos días en otras especies (Dubrosky, 1996). Entonces, para sobrevivir las semillas del desierto deben estar adaptadas para los ciclos de hidratación y deshidratación.

Con la premisa de que las condiciones cambiantes de un ecosistema producen un efecto positivo en aumentar la respuestas de conservación de las semillas, se están realizando experimentos de priming natural, para proveer de lotes de semillas que sean capaces de reiniciar la germinación con plántulas más vigorosas y capaces de sobrevivir a cambios ambientales adversos, o cuando menos más cercanos a lo que de manera natural la semilla se enfrentará. Hegarty (1978) propuso que los ciclos de hidratación y deshidratación en ambientes áridos pueden resultar en una más rápida germinación cuando ocurra una lluvia profusa. Se ha reportado que generalmente ocurre una precipitación baja en los desiertos al inicio de la temporada de lluvias, seguido de una precipitación alta, con lo cual la semilla podrá completar la germinación, gracias a que la memoria de hidratación de la semilla había sido encendida previamente (Dubrosky, 1996).

IV. Movilización de reservas de carbono durante las distintas fases de germinación.

La movilización del material de reserva durante la germinación es esencial, las semillas secas contiene una cantidad de carbohidratos, lípidos y proteínas que funcionaran como fuente de carbono, nitrógeno y energía. Independiente de su

forma de almacenar el carbono, las semillas dispondrán de estas reservas para su crecimiento y posterior establecimiento como organismo autótrofo, podemos distinguir que la movilización ocurrirá esencialmente en dos partes: la primera durante la fase del periodo germinativo, en donde las semillas utilizarán las reservas de corto alcance, es decir aquellas con las que el tejido embrionario se quedó cuando se llevaba a cabo el periodo de secado de la semilla y su maduración (Srivastava, 2002).

La segunda etapa de movilización ocurrirá previo a la salida de la radícula y hasta de que la plántula se establezca como organismo autotrófico. La semilla movilizará los materiales de reserva localizados en tejido extraembrionario tales como almidón, lípidos, proteínas e incluso utilizará los carbohidratos que se encuentran en las paredes celulares, que son fuente rica en xilulosa y manosa (Bradford, 2004).

La composición de las reservas de almacenamiento de las semillas y el órgano en el cual son depositadas difieren y dependen de las especies. Durante la germinación y el crecimiento postgerminativo temprano, las reservas son hidrolizadas hacia moléculas solubles como sacarosa para ser transportada al tejido que propiamente se encuentra desarrollando.

Movilización de lípidos.

Los lípidos de reserva se encuentran principalmente en forma de triacilglicerol (TAG). El TAG es inicialmente hidrolizado por lipasas, que liberarán los ácidos grasos que subsecuentemente serán catabolizados por las enzimas de la β -oxidación y el ciclo del glioxilato. La expresión temporal de los genes que codifican a estas enzimas se conoce que son altas entre el primer y segundo día después de la imbibición en semillas de *Arabidopsis*, para luego caer a niveles muy bajos o indetectables. Aún cuando se conoce que desde el comienzo de la hidratación los lípidos se están degradando activamente, se sabe que la degradación de lípidos

no es esencial para que ocurra la germinación, pero sí para el desarrollo posterior (Eastmond y Graham, 2001).

Al inicio de la germinación el acetil-CoA proveniente de los ácidos grasos es utilizado para la síntesis de ATP, a través del ciclo de Krebs, pero conforme avanza la germinación los glioxisomas maduran y el ciclo del glioxilato (una forma modificada del ciclo de Krebs) se vuelve funcional (Eastmond y Graham, 2001), es decir las dos enzimas clave de este ciclo, se conoce que ya se están expresando, la malato sintasa (MS) y la isocitrato liasa (ICL). Así dos moles de acetil-CoA son introducidas en cada vuelta del ciclo del glioxilato, resultando en la síntesis de 1 mol de 4 carbonos en forma de succinato. El succinato entra a la mitocondria y es utilizado por el ciclo de Krebs para producir malato. Entonces el malato es exportado hacia el citosol en intercambio con succinato y es convertido en oxalacetato por la malato deshidrogenasa citosólica. La fosfoenol piruvato (PEP) carboxicinasa convierte el oxalacetato en PEP para conducir hacia la vía gluconeogénica (Figura 2) (Eastmond y Graham, 2001).

Uno de los moduladores de la expresión de las enzimas clave del ciclo del glioxilato se conoce que es la sacarosa, ya que cuando se colocan semillas a crecer en medio suplementado con sacarosa, se retrasa la aparición de los glioxisomas (Eastmond y Graham, 2001). Pero cuando el carbohidrato se acaba los lípidos son metabolizados rápidamente hacia sacarosa para que el crecimiento post-germinativo del embrión sea sustentado.

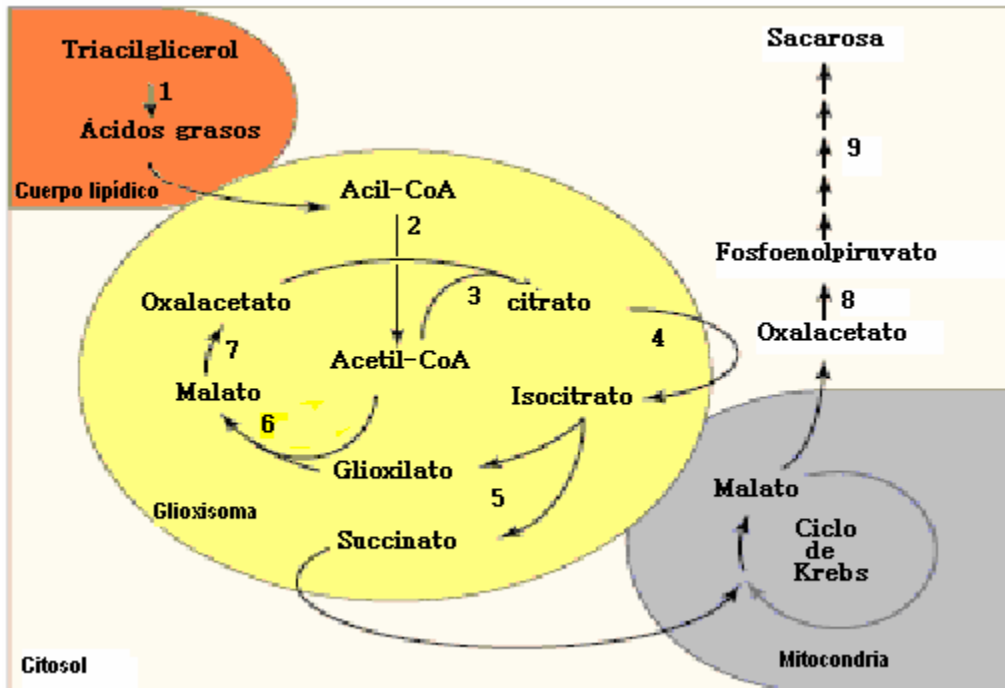


Figura 2. Interconversión de lípidos en carbohidratos. Los números representan enzimas o vías metabólicas. 1, Lipasa de triacilglicerol; 2, β -oxidación; 3, citrato sintetasa; 4, aconitasa; 5, isocitrato liasa; 6, malato sintasa; 7, malato deshidrogenasa; 8, fosfoenolpiruvato carboxicina; 9, gluconeogenesis. (tomado de Eastmond y Graham, 2001).

Movilización de carbohidratos.

Al inicio los ejes embrionarios utilizarán como reserva inicial de carbono la sacarosa, rafinosa o los oligosacáridos almacenados en el propio tejido embrionario. Se ha encontrado en maíz, que la actividad de las invertasas ácidas en el eje embrionario es mayor y comienza desde el inicio de la germinación, llevando a una reducción del 60% de la sacarosa disponible en el eje embrionario durante las primeras 8 h de germinación (Martínez-Marcelo, 2008).

La movilización significativa de las reservas localizadas en el endospermo en el caso de los cereales, ocurre generalmente después de la protusión de la radícula. Un proceso regulado por hormonas, principalmente por el ácido giberélico, el cual es sintetizado en el embrión y el escutelo y movilizadо hacia una capa de células denominada aleurona. La aleurona es capaz de sintetizar un amplio espectro de enzimas hidrolíticas, incluidas en éstas las α -amilasas (Bradford, 2004). El almidón es hidrolizado primero por varias α -amilasas rompiendo las uniones internas α -1-4, de las cadenas del almidón, liberando cadenas pequeñas de amilosa, sustrato de la β -amilasa. Las uniones β -1,6 de la amilopectina no pueden ser hidrolizadas por las amilasas, es necesaria la acción de enzimas específicas denominadas enzimas desramificantes, liberando amilosa que requiere posterior degradación. La maltosa es convertida en glucosa por la alfa-glucosidasa y la glucosa es convertida en sacarosa vía la UDPG-Glc pirofosforilasa y la sacarosa-6P sintetasa (Figura 3).

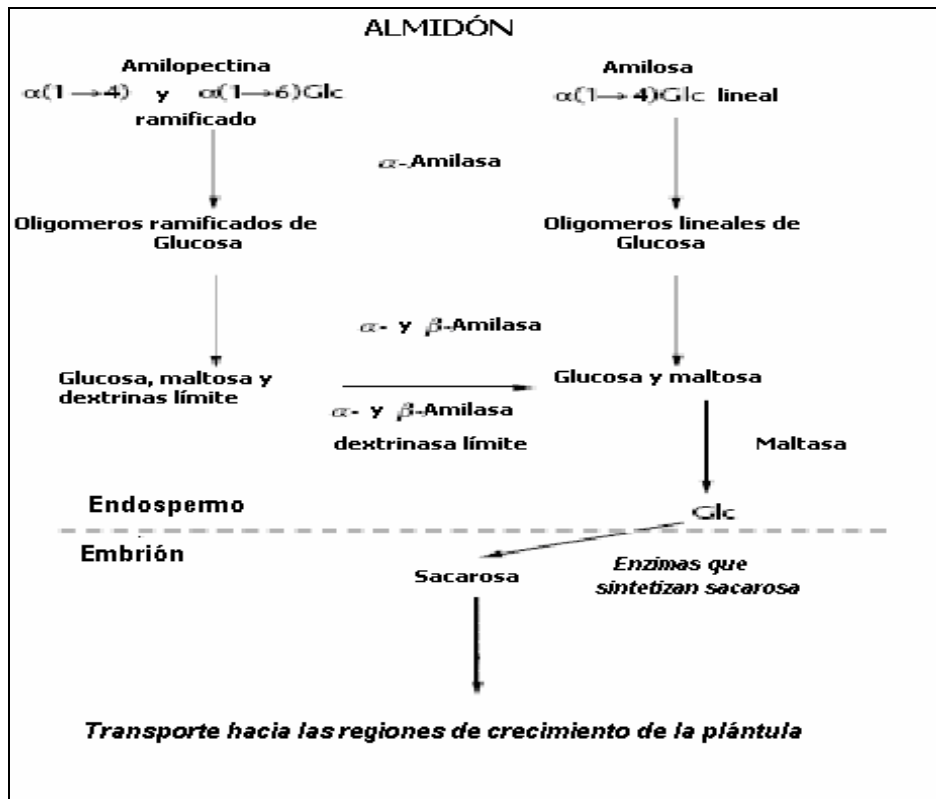


Figura 3. Hidrólisis de los granos de almidón en granos de cereales por amilosis. Adaptado de Bewley, 2001.

Movilización de proteínas.

En los cereales el sitio en donde se almacenan la mayor parte de las proteínas es en las células no vivas del endospermo. En el endospermo seco se encuentran preformadas proteasas que se activan cuando la hidratación comienza. Una vez hidrolizadas las proteínas en el endospermo, sus productos de peso molecular pequeño son tomados activamente por el escutelo, en donde son hidrolizados hasta producir los aminoácidos. Los aminoácidos son transportados hacia las regiones de crecimiento en el eje embrionario, usualmente después de que son convertidos a las amidas, glutamina y asparagina (Bewley, 2001).

JUSTIFICACIÓN

Una de los más importantes mecanismos de sobrevivencia de las plantas del desierto es el tiempo en el cual germinan. El agua es un factor limitante en los ambientes áridos y juega un papel crucial en la germinación. Como resultado de los patrones discontinuos de lluvias, las semillas pueden pasar por diferentes etapas de hidratación y deshidratación, que en el laboratorio son conocidos como tratamientos de priming. Los tratamientos de priming de laboratorio se han aplicado a semillas de plantas hortícolas y otros cultivos, para beneficiar su capacidad, sincronía y velocidad de germinación, además de que las plantas resultantes presentan mejor emergencia, supervivencia y tolerancia al estrés.

Los fenómenos de priming natural distan de ser entendidos, sobre todo a nivel molecular. Los eventos moleculares que se inician y recuerdan, la memoria hídrica de la semilla, han sido poco explorados en el campo, pese a su impacto económico y de que pueden cumplir con un papel importante en la naturaleza, debido a la sobrevivencia mayor de las plántulas que experimentaron el priming (González- Zertuche *et al.*, 2001).

Las fases I y II de la germinación se avanzan durante el priming, en donde se llevan a cabo los procesos de reparación de estructuras y macromoléculas, así como de mayor actividad metabólica. Por lo que en el presente trabajo, se enfoco en estudiar el efecto de dos tipos de priming natural, realizados a través del enterramiento de las semillas en dos zonas de exposición distinta a la irradiación solar, sobre la actividad metabólica de enzimas importantes en la movilización de carbono durante la germinación y el periodo post-germinativo temprano, con la finalidad de encontrar enzimas que pudieran verse afectadas y que fueran relevantes para que la germinación proceda o bien para el establecimiento de la plántula como organismo autotrófo. La semilla en estudio es la *Opuntia tomentosa*, especie que tiene una aplicación potencial en programas de restauración de zonas áridas.

HIPOTESIS

- Si el priming natural acelera la germinación y la sincroniza, entonces el proceso de movilización de carbono se encontrará activado en las semillas secas que pasaron por el priming.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Analizar el efecto del priming natural en la movilización del material de reserva en la semilla seca durante la germinación de semillas de *Opuntia tomentosa*.

Objetivos particulares

- Determinación del efecto del tratamiento de priming en la curva de germinación de las semillas de *Opuntia tomentosa*.
- Medición del consumo de oxígeno.
- Cuantificación de algunos componentes fuente de carbono para la germinación de la semilla como: almidón, carbohidratos solubles y lípidos.
- Montaje de la metodología de determinación de actividad enzimática *in situ*.
- Determinación del efecto del priming natural en los niveles de enzimas importantes en el metabolismo de carbono, entre ellas las invertasas ácidas y malato sintasa.

MATERIALES Y METODOS

Material Biológico

Se utilizaron tres lotes de semillas del género *Opuntia tomentosa*, dos de ellos recibieron un tratamiento de priming natural. El primer lote se guardó en el laboratorio (control) y los otros dos lotes se fueron previamente sometidos a un tratamiento denominado de escarificación, el cual consiste en sumergir a las semillas por 2 min. en H_2SO_4 concentrado. Las semillas se enjuagaron y se dejaron secar a temperatura ambiente y posteriormente se realizó el tratamiento de priming natural. El priming se realizó al enterrar en bolsas de organza por aproximadamente 2 meses en dos diferentes condiciones, en suelo que se encontraba cercano a una zona con vegetación, el cual se denominó tratamiento de priming cerrado, o bien se enterraron en una zona donde no había vegetación, denominado tratamiento de priming en zona abierta.

Germinación.

Se lavaron las semillas con una solución de hipoclorito de sodio al 30% durante 10 minutos con agitación, después se enjuagaron abundantemente con agua estéril. Posteriormente se sembraron en agar al 1% y se germinaron durante 0, 4 y 24 horas a una temperatura de $29\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se usaron inmediatamente las semillas, excepto para la determinación de contenido de lípidos y carbohidratos, en los que al término del tiempo de incubación se congelaron con N_2 líquido y se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Ensayo de respiración de semillas (consumo de oxígeno).

Se germinaron 25 semillas de cada uno de los lotes por 4 y 24 h en agar al 1% a $29\text{ }^{\circ}\text{C}$. Debido a que la testa de las semillas de *O. tomentosa* son impermeables al paso de agua y oxígenos, para determinar la respiración, las semillas se fracturaron ligeramente al lijarlas antes de ser germinadas, posteriormente se adicionaron a 5 mL de agua y se monitoreó el consumo de oxígeno por 4 minutos.

Se midió el consumo de oxígeno con un electrodo tipo Clark conectado a un oxímetro y el oxígeno consumido se calculo con la siguiente fórmula:

Fórmula 1

$$\text{Consumo de } O_2 = \frac{1200 \text{ nanoátomos de } O_2 * 60 \text{ min} * \gamma * 1}{20 \text{ cm} * 1h * 1 \text{ min} * \text{número de semillas}}$$

Donde:

1200 nanoátomos/20 cm = Corresponden al número total de nanoátomos de O_2 en 20 cm de la escala del papel graficador.

γ = La distancia en centímetros que se obtiene en la pendiente del trazo problema y que corresponde al número de nanoátomos de O_2 consumidos por las semillas en 1 minuto.

Extracción de carbohidratos solubles: glucosa, fructosa y sacarosa.

Se realizo según se detalla en Ramírez-Palma (2007). Brevemente, se molieron en N_2 líquido las semillas hasta obtener un polvo fino. Se peso 0.1 g de tejido molido y se extrajeron los carbohidratos con 1 mL de etanol al 80% (v/v) a $70^\circ C$, seguida de una extracción con 0.5 mL de agua en ebullición, ambas fracciones se mezclaron. Se centrifugo el extracto en un eppendorf a 14000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se trasfirió a un tubo de vidrio (el botón se uso para determinar almidón), después se llevo acabo la evaporación del disolvente (etanol-agua) llevándolo a un temperatura constante de $60^\circ C$ durante 2 o 3 días. Después de evaporar totalmente el disolvente, las muestras se resuspendieron en 100 μL de agua.

Cuantificación de azúcares solubles: glucosa, fructosa y sacarosa.

La cuantificación de glucosa y fructosa se llevó acabo mediante un ensayo enzimático en microplaca, según el método de Ramírez-Palma (2007); se colocó la muestra problema (máximo 12 μl) en el pozo, se adicionaron 200ul del el reactivo de ensayo de glucosa que contiene 1.0 mM ATP, 1.5mM NAD^+ , 1.0 U/ml Glucosa-6P deshidrogenasa y 1.0 U/ml hexocinasa y se incubo durante 20 min a

temperatura ambiente, después se leyó la absorbencia a 340nm. El valor obtenido es directamente proporcional a la concentración de glucosa en la muestra. Posteriormente se agregaron 2µL de 600U de fosfoglucoasa isomerasa, se mezcló y se incubó por 15 min y se leyó la absorbencia a 340nm. La diferencia de esta segunda absorbencia con la primera es la concentración de fructosa en la muestra. La fórmula 2 se usó para conocer los mg de glucosa o fructosa en la muestra.

Para la determinación de sacarosa se realizó una hidrólisis en medio ácido de la sacarosa de la muestra (12µL máximo), adicionando invertasa de levadura de SIGMA (4µL de una solución de 80mg/mL de invertasa disuelta en acetato de magnesio 100mM a pH 4.5), se incubó por 2h a 37°C y posteriormente se determinó el contenido de glucosa como se describió anteriormente.

Fórmula 2

$$Glu\ cos\ a = \frac{(Abs_m - Abs_b) * Vol. * 0.00614F.}{g_{tejido} * Vol._{susp}} = mg / g_{tejido}$$

Donde:

Abs: absorbencia _{340nm}

F: factor de dilución

Vol: volumen de la alícuota.

Vol_{susp}: Volumen de resuspensión

Cuantificación de almidón:

El botón obtenido de la extracción de carbohidratos solubles se resuspendió en 1.5 mL de agua y se calentó a 90°C durante 4 h para su gelatinizado. El almidón ya gelatinizado se mezcló 1:1 con aminoglucosidasa de *Aspergillus niger* (Fluka BioChemika 10115, aminoglucosidasa disuelta 14mg/ml en amortiguador de acetatos 0.2 M, pH 4.5), esta mezcla se incubó toda la noche a 37°C, y

posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se usó para medir glucosa proveniente de la hidrólisis de almidón mediante el ensayo enzimático para determinar glucosa.

Cuantificación de Lípidos.

En el mortero se molieron 0.1 g de tejido con 5 mL de una solución de cloroformo-metanol (2:1), posteriormente en un tubo de ensayo se centrifugó a 3000 rpm por 5 min (rotor de columpio 1624, centrífuga Hettich Universal 320R), el sobrenadante obtenido se transvasó a un tubo de ensayo rotulado y a peso constante, el botón se homogenizó adicionando 2.5 mL de la misma solución y se centrifugó a 3000 rpm por 5 min. El sobrenadante se mezcló con el primer sobrenadante. El tubo se calentó a 70⁰C en un bloque de calentamiento hasta que los disolventes fueron eliminados. Finalmente el contenido de lípidos se calculó por diferencia de peso.

Análisis de lípidos por cromatografía en capa fina.

Se resuspendieron los lípidos extraídos del paso anterior con cloroformo posteriormente se agitaron vigorosamente y se aplicaron en placas de 10X20cm de gel de sílice para su análisis por cromatografía en capa fina (TLC). Las placas se desarrollaron hasta la mitad con cloroformo:metanol:ácido acético:agua (170:30:20:70, v/v), se sacaron de la cámara y se dejaron secar. Se volvieron a colocar las placas en la cámara y se desarrollaron hasta el final con hexano:éter etílico:ácido acético (70:30:1, v/v). Los lípidos polares se separan en la primera mitad de la placa, los neutros en la segunda mitad (Stobart *et al.*,1997). El revelado de las placas para el caso de los fosfolípidos se llevó a cabo una solución al 40 % de MoO₃ en H₂SO₄ 25N y los lípidos neutros con vapores de yodo (Touchstone, 1992).

Se cuantificaron los lípidos realizándose la densitometría de cada una de las bandas usando la paquetería que viene incluida en Fluor-STM Multilmager, BIO-RAD. Se identificaron algunas de las bandas, según el corrimiento de diferentes

concentraciones de los estándares en las placas de TLC. Con las densitometrías se llevaron a cabo estándares, En las Figuras 4, 5, 6, 7, y 8 se muestran las curvas estándares de fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), diacilglicerol (DAG), triacilglicerol (TAG) y ácido oleico (AO).

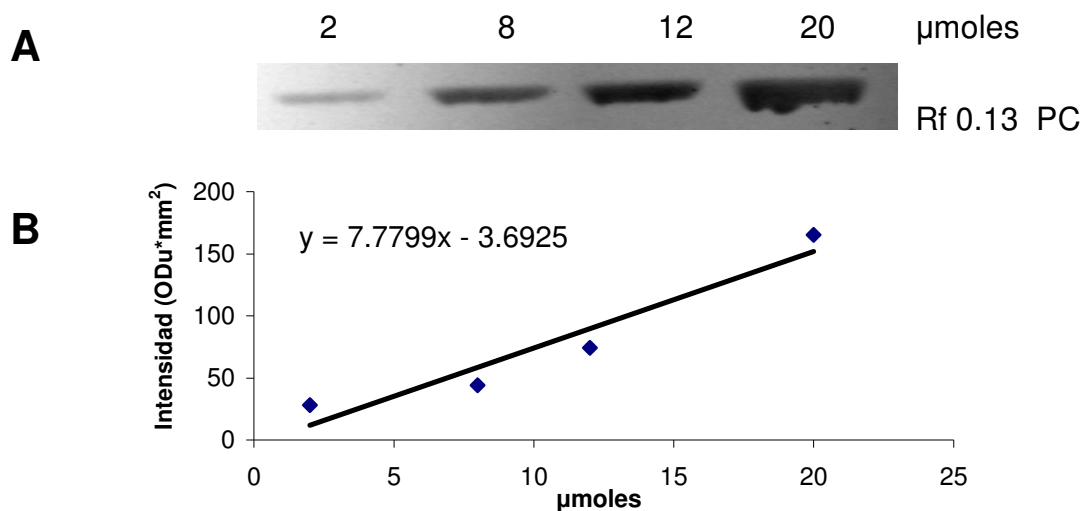


Figura 1. Curva estándar de fosfatidilcolina (PC) obtenida mediante TLC.

A, cromatograma que muestra diferentes concentraciones de PC, así como el valor de Rf de PC, **B**, curva que se obtiene después de la densitometría de las bandas de A, se obtuvo los parámetros de la regresión lineal para calcular la concentración de las muestras problema. El corrimiento cromatográfico de las muestras se realizó con la fase móvil cloroformo:metanol:ácido acético:agua (170:30:20:70, v/v), el revelado se hizo con una solución MoO₃/H₂SO₄.

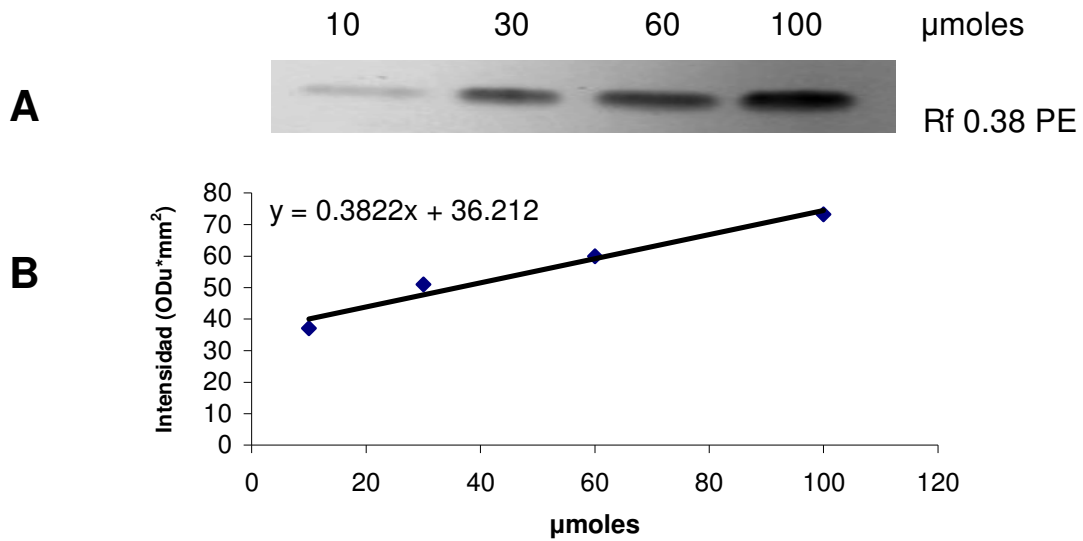


Figura 2. Curva estándar de fosfatidiletanolamina (PE) obtenida mediante TLC.

A, cromatograma que muestra diferentes concentraciones de PE, así como el valor de Rf de PE, **B**, curva que se obtiene después de la densitometría de las bandas de A, se obtuvo los parámetros de la regresión lineal para calcular la concentración de las muestras problema. El corrimiento cromatográfico de las muestras se realizó con la fase móvil cloroformo:metanol:ácido acético:agua (170:30:20:70, v/v), el revelado se hizo con una solución MoO₃/H₂SO₄.

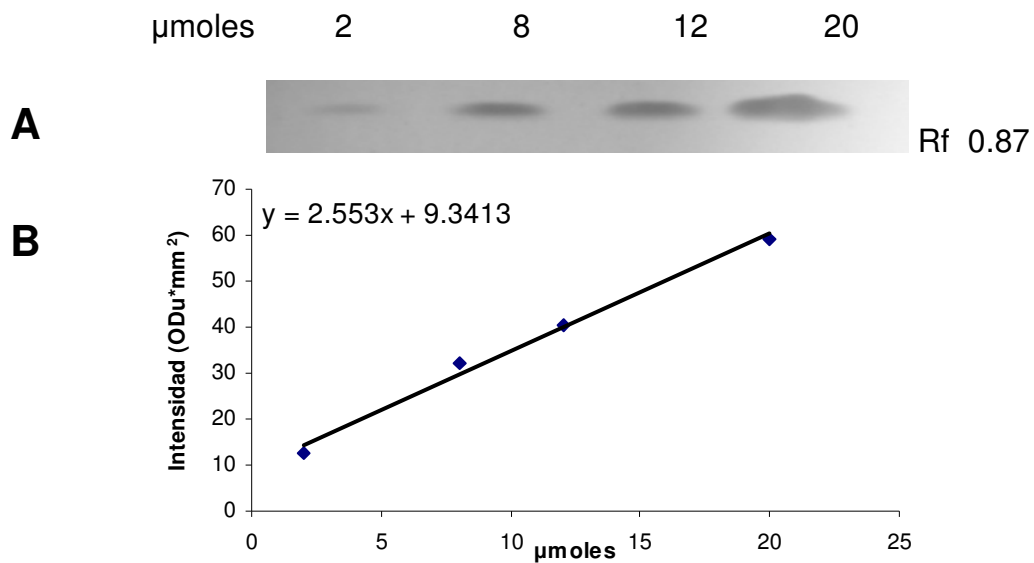


Figura 3. Curva estándar de ácido oleico (O.A) obtenida mediante TLC.

A, cromatograma que muestra diferentes concentraciones de OA, así como el valor de Rf de AO, **B**, curva que se obtiene después de la densitometría de las bandas de A, se obtuvo los parámetros de la regresión lineal para calcular la concentración de las muestras problema. Se utilizó como fase móvil hexano:éter etílico:ácido acético (70:30:1, v/v), y vapores de yodo como solución reveladora.

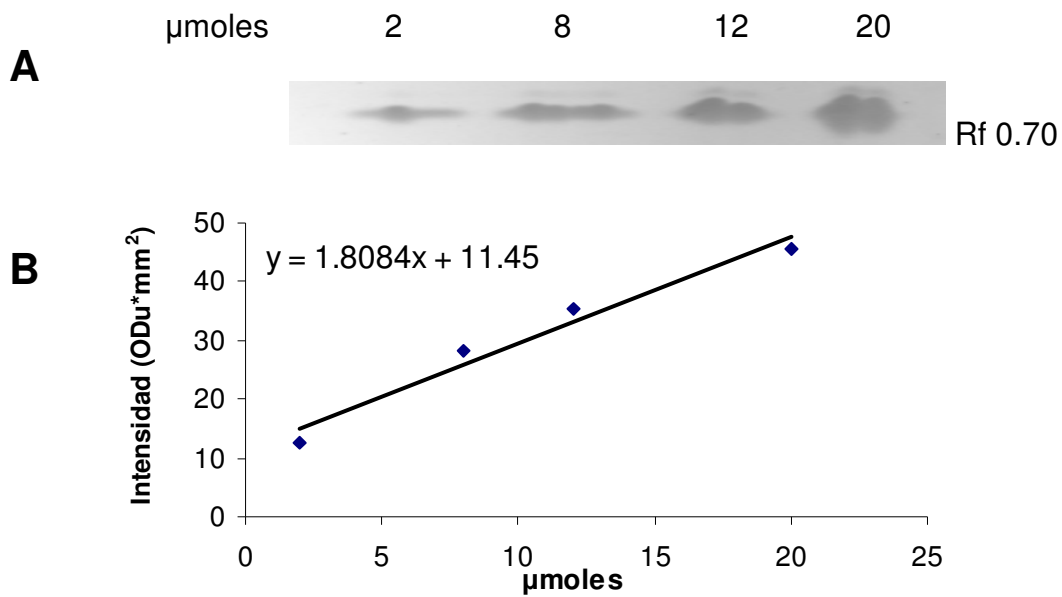


Figura 4. Curva estándar de Diacilglicerol (DGA) obtenida mediante TLC.

A, cromatograma que muestra diferentes concentraciones de DGA, así como el valor de Rf de DGA, **B**, curva que se obtiene después de la densitometría de las bandas de A, se obtuvo los parámetros de la regresión lineal para calcular la concentración de las muestras problema. Se utilizó como fase móvil hexano:eter etílico:ácido acético (70:30:1, v/v), y vapores de yodo como solución reveladora.

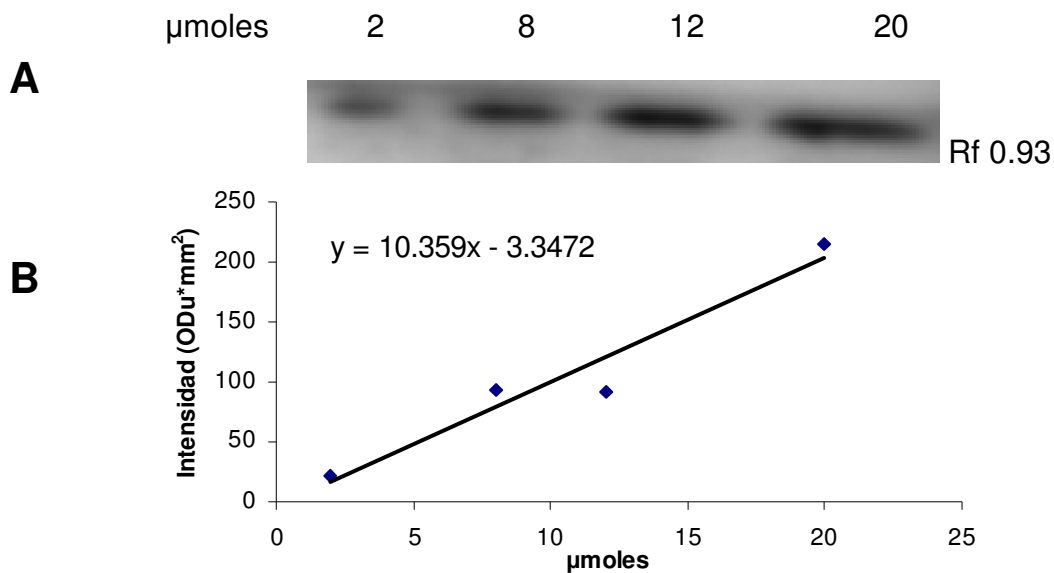


Figura 5. Curva estándar de ácido oleico (TAG) obtenida mediante TLC.

A, cromatograma que muestra diferentes concentraciones de TAG, así como el valor de Rf de TAG, **B**, curva que se obtiene después de la densitometría de las bandas de A, se obtuvo los parámetros de la regresión lineal para calcular la concentración de las muestras problema. Se utilizó como fase móvil hexano:éter etílico:ácido acético (70:30:1, v/v), y vapores de yodo como solución reveladora.

Detección in situ de actividad enzimática en semillas o embriones de O. tomentosa.

Debido a que el número de semillas que se tuvieron para el estudio eran pocas se decidió realizar el ensayo de actividad de enzimas importantes en la movilización de carbono, mediante una técnica *in situ* (Baud y Graham, 2006).

Fundamento. Todas las actividades determinadas producían un compuesto reducido NADH o NADPH y acoplamos a esta reacción a la reducción del nitroazul de tetrazolio, sal que al tomar los protones se precipita en una sal de formazan color azul-violeta (Figura 6). Se monitorea a diferentes tiempos la actividad mediante un microscopio estereoscópico conectado a una cámara digital. El programa en la cámara integra la imagen del microscopio a la variación densitométrica, según se describe en Baud y Gramham, 2006.

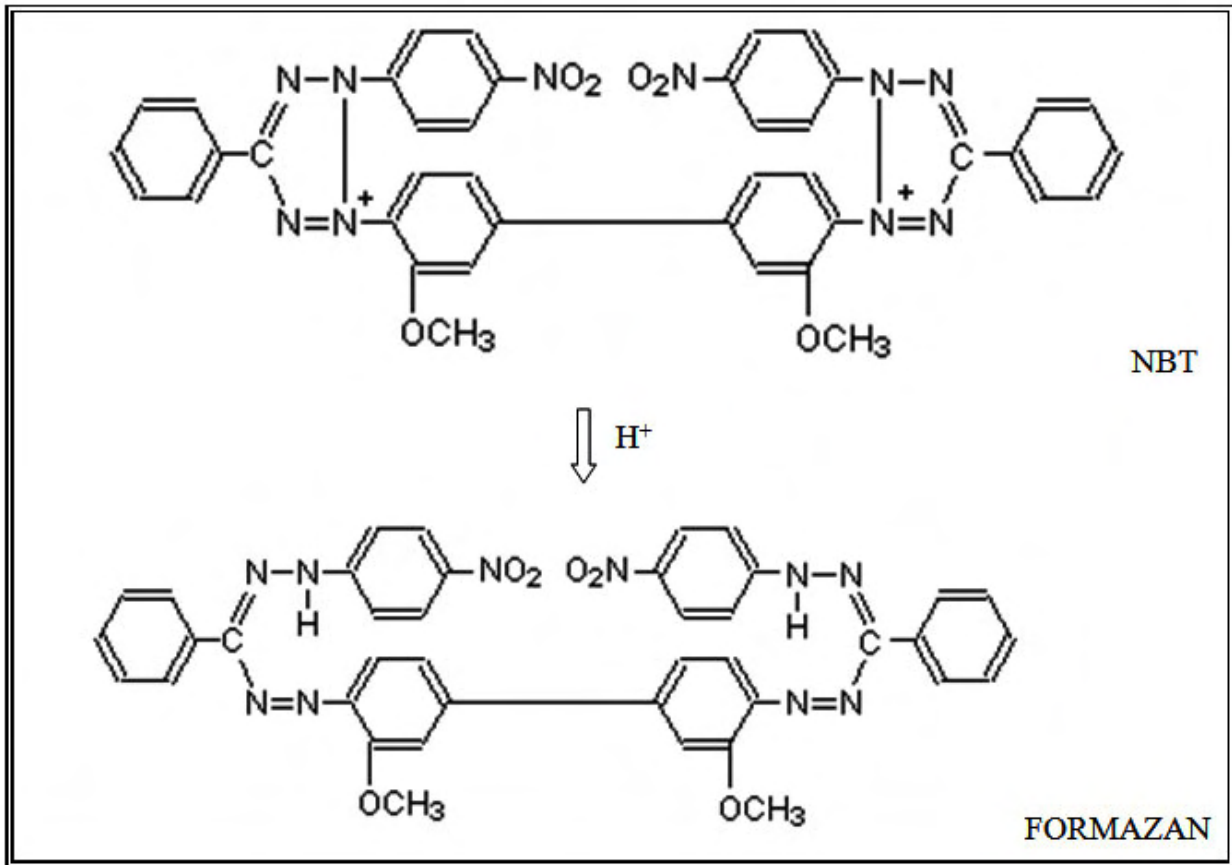


Figura 6. Reacción de reducción del NBT por protones. El precipitado que se forma es la sal de formazan. Tomado de <http://stainsfile.info/StainsFile/dyes/nbt.htm>.

Fijación. La fijación del tejido se realiza después de haber sumergido al embrión de la semilla de *O. tomentosa* en 1 ml de paraformaldehído al 2% con polivinilpirrolidona-40 al 2% y 1mM de DTT, a 4⁰C por 1 h en un microtubo. Después de la fijación se centrifuga a bajas velocidades. El sobrenadante se descarta y el botón se lava 5 veces con 1 ml de agua destilada y se almacena toda la noche a 4⁰C.

Detección de actividades enzimáticas

Invertasa. La actividad de invertasa ácida se determinó según Bergmeyer y Bernt (1974) pero modificado a un volumen final de ensayo de 200μL. Semillas o embriones cortados longitudinalmente se colocan en 25 μl de 200 mM de acetato de sodio (pH 4.8). La reacción enzimática comienza añadiendo 10 μl de 600 mM

de sacarosa e incubando a 30°C por 15 minutos. Para determinar los productos de la reacción primero se ajusta el pH a 7.0 añadiendo 50 µl de 0.5mM de NaH₂PO₄. La glucosa y la fructosa se determinaron enzimáticamente adicionando a la mezcla anterior 200 µl de medio de reacción que contiene 50 mM de HEPES/KOH pH 7.0, 2 mM MgCl₂, 1mM EDTA, 1mM ATP, 3.5 U de fosfoglucoasa-isomerasa, 2 U de glucosa-6 fosfato-deshidrogenasa, 4.2 U de hexocinasa, 0.5mM NADP⁺ y 0.4 mM de nitroblue tetrazolio (NBT), éstos dos últimos se añadían justo antes de incubar al embrión con la solución de revelado. Se incubó por 1 h 50 min a 30°C, registrando cada 30 minutos el cambio de coloración del tejido.

Las actividades enzimáticas de la malato sintetasa y las enzima málica dependiente de NAD⁺ y NADP⁺ se determinaron según se describe en Baud y Graham, 2006

Malato sintasa. Se utilizaron embriones de *O.tomentosa* previamente fijados. Se colocaron en un medio de reacción que contenía 85 mM Tris-HCl (pH 8.0), 8 mM MgCl₂, 0.2 mM Acetil CoA, 2 mM glioxilato, 6 U mL⁻¹ de malato deshidrogenasa, 1mM NAD⁺ y 0.0.37mM de NBT y se incubo por 1h a 30⁰C, se registro el cambio de color de los embriones por 50 min a cada 10 min.

Análisis estadístico.

Se llevó a cabo en todos los casos un análisis de varianza de dos vías con un nivel de probabilidad $P \leq 0.01$, utilizando un programa estadístico (Statistica, versión 6.1. Statsoft, Inc. 1984-1998 Tulsa, Ok, U.S.A.). En los casos donde se presenta diferencia significativa entre tratamientos, se realizó un análisis de comparaciones múltiples por el método de Tukey-Kramer. Indicando el valor del parámetro F respecto a los valores del parámetro F respecto a los valores del grado de libertad, comparándolo con el valor de la probabilidad (p) que proporciona el programa utilizado.

RESULTADOS

*Efecto del priming natural en el perfil germinativo de semillas *O. tomentosa*.*

Se obtuvo el perfil germinativo de tres lotes de semillas *O. tomentosa*, el lote control y los dos lotes que pasaron por el tratamiento denominado “priming” natural. Cuando la zona en la que se enterraron las semillas estaba cercano o era cubierto por el dosel de los árboles, le llamamos “priming” natural en cerrado; cuando no había árboles cerca del lugar donde se enterraron las semillas se le denominó “priming” natural en abierto. Después del tratamiento de priming las semillas se secaron a contenidos de humedad similares a los del control para que no continuaran con el proceso germinativo.

El priming se conoce que produce un aumento en la velocidad y sincronización en la germinación. En la Figura 10 se puede observar que efectivamente las semillas que fueron sometidas a los tratamientos de priming natural germinan antes que las control. Adicionalmente y de manera interesante las semillas tratamiento comienzan a germinar a un tiempo muy corto, las 4 h.

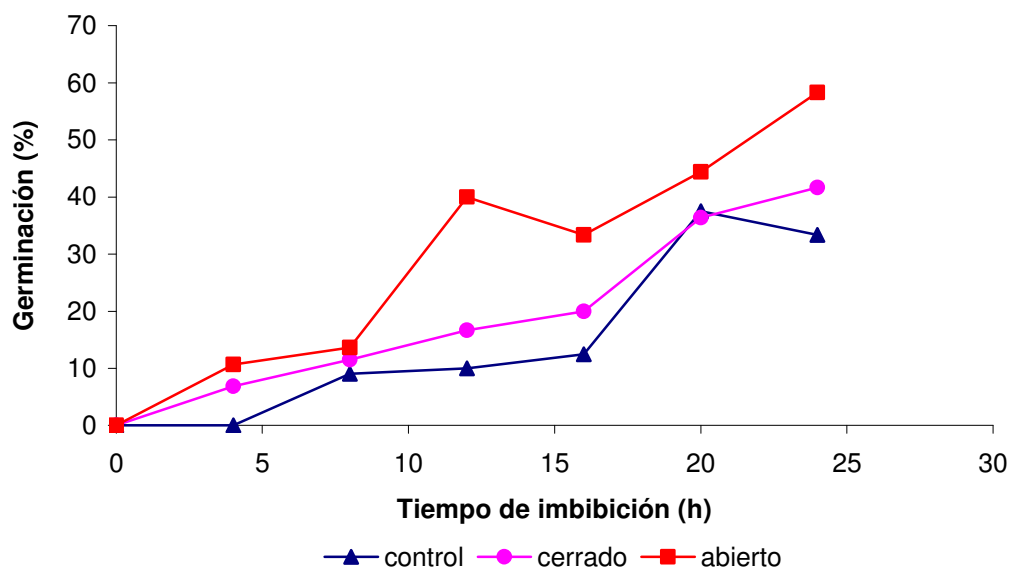


Figura 1. Curva de germinación de semillas de *O. tomentosa* que fueron sometidas a dos diferentes tratamientos de priming natural. Se colocaron a germinar 20 semillas por cada lote y se incubó a 29 °C y se contó el número de semillas germinadas.

Efecto del priming natural en la toma de oxígeno de las semillas de *O. tomentosa*.

Con el objeto de determinar si efectivamente a un tiempo tan corto como 4 h las semillas con priming comenzaban a germinar, se determinó la capacidad respiratoria de las semillas a este tiempo y se comparó con el control (Figura 11).

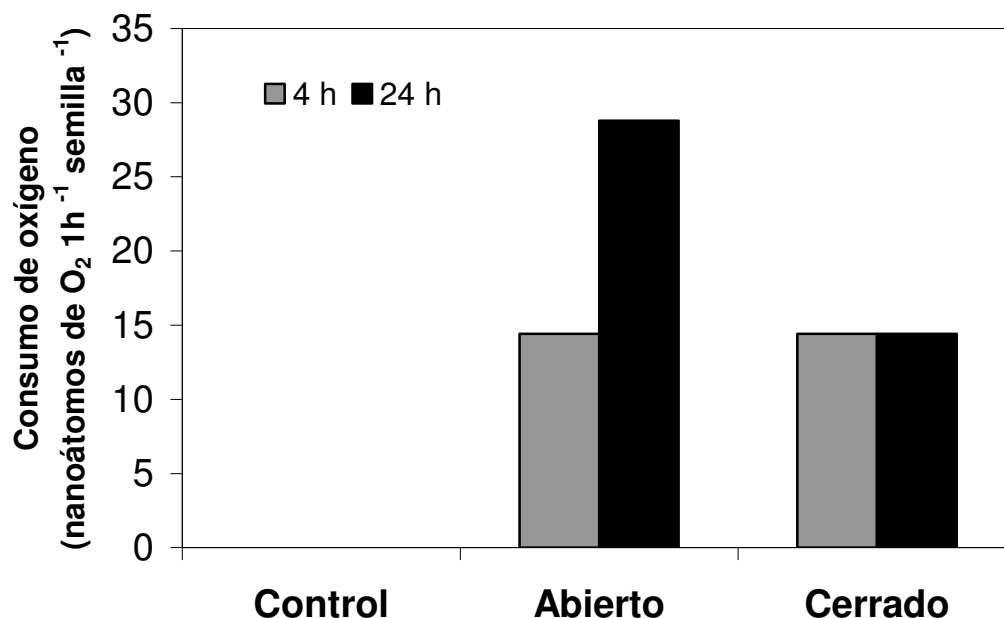


Figura 2. Comparación del consumo de oxígeno de los tres lotes de semillas de *O. tomentosa* a dos tiempos de germinación. Se germinaron 25 semillas del lote control y 25 de los lotes con priming por 4 y 24 h. Para determinar la respiración las semillas se fracturaron ligeramente mediante una lija antes de ser germinadas y se midió el consumo de oxígeno con un electrodo tipo Clark conectado a un oxímetro, como se describió en materiales y métodos.

No se detectó capacidad respiratoria en las semillas control a los dos tiempos examinados, es probable que se necesite un mayor número de semillas para poder detectarlas, pero como contamos con una cantidad reducida de éstas para el desarrollo del proyecto, no se realizó el experimento con más semillas. No obstante, las semillas tratadas con priming si presentaron respiración desde las 4 h. Las semillas con priming cerrado presentaron un consumo de oxígeno similar a las 4 y 24 h, mientras que las semillas con priming en abierto a las 4 h respiran a una velocidad similar que las semillas con priming en cerrado, pero a las 24 h aumenta la respiración 2 veces.

Lo anterior se puede explicar por la morfología que presentan los embriones a las 0, 4 y 24 h para cada uno de los lotes (Figura 12). Las semillas que fueron sometidas a priming a las 0 h presentan una morfología muy distinta al del control. Las semillas con priming son más planas y delgadas y a las 4 h las diferencias son mayores, la radícula ya se alargó en las semillas con priming. Lo que corrobora el porque al medir el consumo de oxígeno las semillas con priming ya respiraban mientras que el control no.

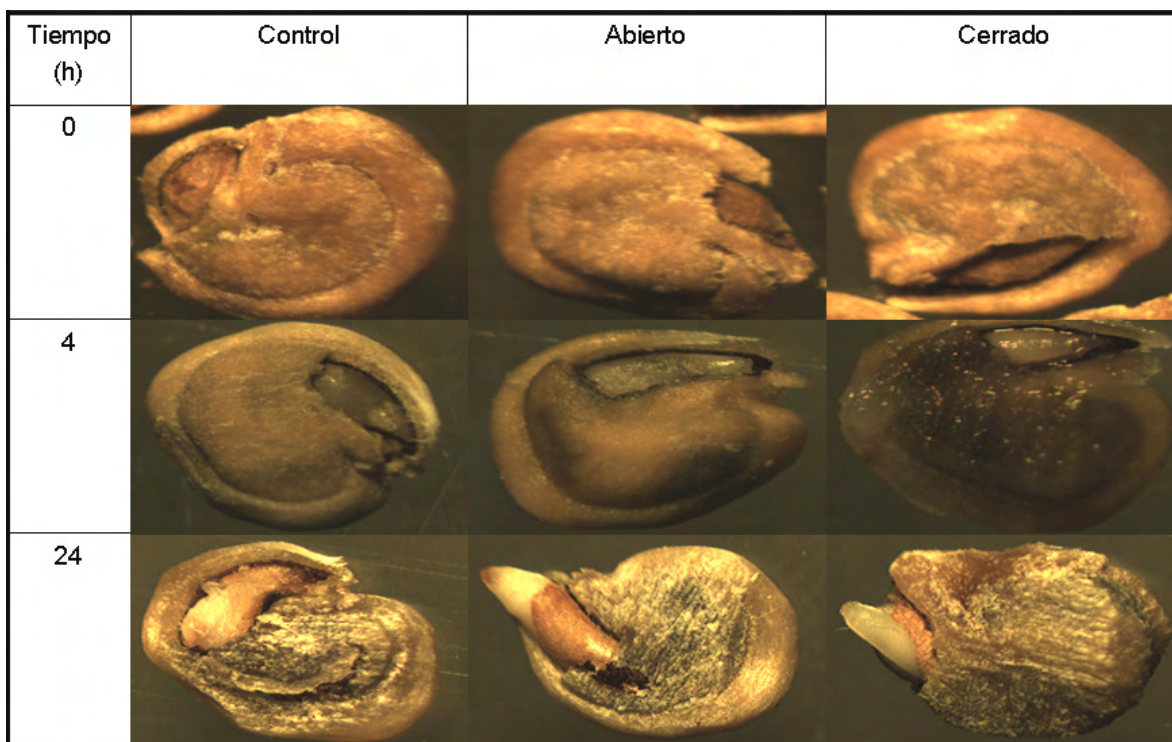


Figura 3. Morfología comparada de los embriones de semillas de *O. tomentosa* sometidas al priming natural. Se germinaron semillas del lote control y de los lotes con priming por 0, 4 y 24 h en agar al 1%.

El “priming” natural acelera la movilización de carbono en semillas de *O. tomentosa*.

Durante las primeras horas de la germinación se utilizan los compuestos que se encuentran en las células propias del embrión, posteriormente a su germinación se movilizan de manera masiva las reservas de tejidos extraembrionarios (Bewley y Black, 1994). Para conocer cual o cuales eran las vías metabólicas adelantadas en la semillas

que fueron tratadas con priming, se determinaron primero algunos metabolitos como glucosa, fructosa, sacarosa, almidón y lípidos. En vista de que el embrión a las 4 h de germinación ya respira y la radícula ya se alongó, se escogieron los tiempos de 0 y 4 h para determinar el perfil de metabolitos.

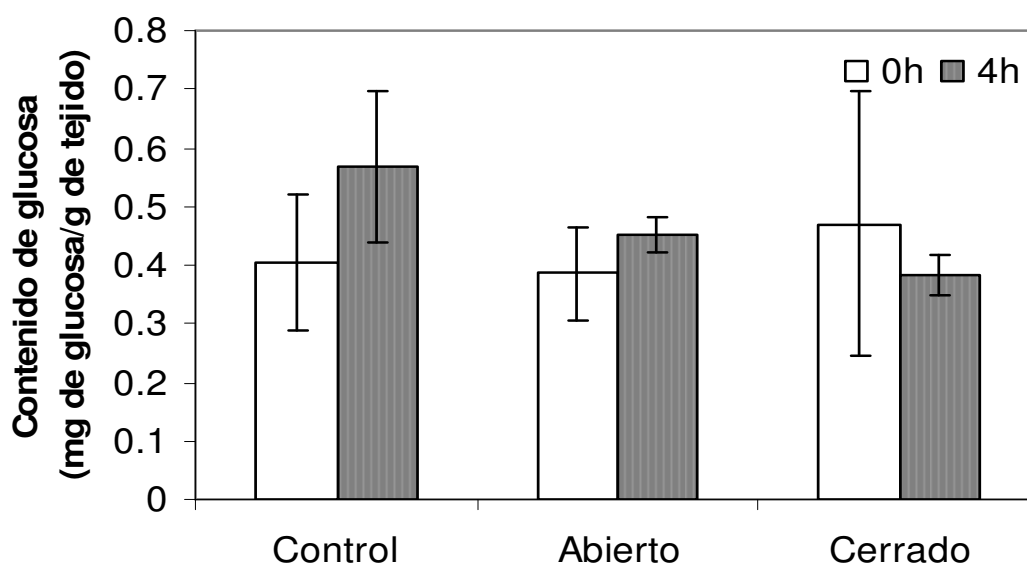


Figura 4. Contenido de glucosa en semillas de *O. tomentosa* sometidas a priming natural cerrado y abierto. La glucosa se determinó por un método enzimático según se describió en materiales y métodos. Cada punto corresponde a la determinación del carbohidrato en dos lotes de semillas germinadas independientemente y cada muestra realizada por cuadruplicado. Datos expresados en medias \pm error estándar.

Se puede observar que el perfil del contenido de glucosa en la semilla seca y durante la germinación es similar en los tres lotes de semillas (Figura 13). El análisis estadístico de los datos nos mostró que efectivamente no hay diferencias significativas entre los tiempos y los tratamientos examinados ($F(2,39)=4.12$; $p=0.023$).

De manera similar, los niveles de fructosa al tiempo cero no presentaron diferencias en los tres lotes de semillas (Figura 14). Pero a las 4 h de imbibición se observó que el control tiene más fructosa que los tratamientos de priming, 2.8 y 3 veces más respecto al abierto y al cerrado respectivamente. Tanto el mayor contenido de fructosa en el control como las diferencias con los tratamientos son significativas ($F(2,36)=10.46$; $p<0.0002$).

El aumento en el contenido de fructosa después de 4h de imbibición puede ser ocasionado por el aumento en la degradación de sacarosa.

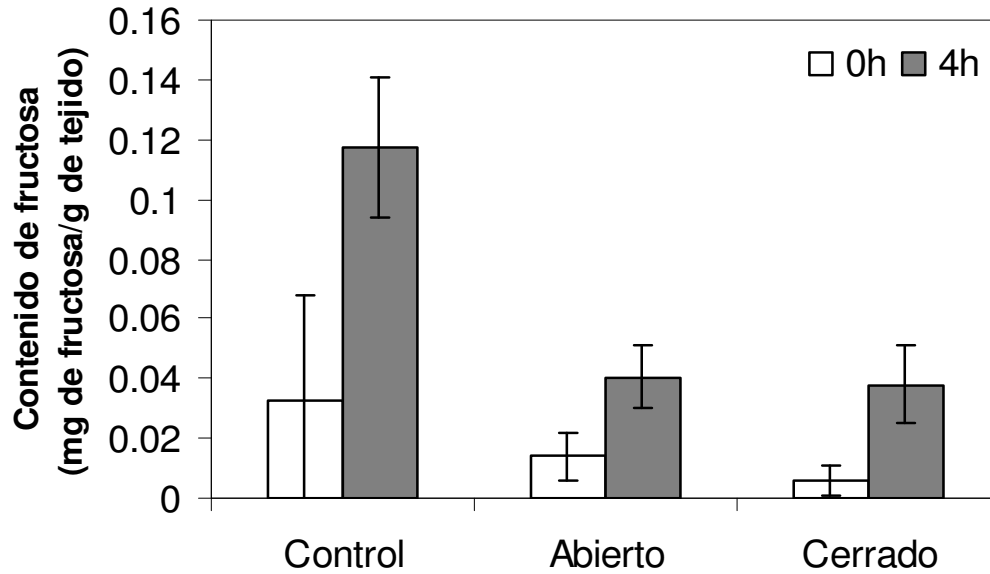


Figura 5. Contenido de fructosa en semillas de *O. tomentosa* sometidas a priming natural cerrado y abierto. La fructosa se determinó en la misma muestra en donde se determinó glucosa, mediante un método enzimático según se describió en materiales y métodos. Cada punto corresponde a la determinación del carbohidrato en dos lotes de semillas germinadas independientemente y cada muestra realizada por cuadruplicado. Datos expresados en medias \pm error estándar.

Para determinar si la fructosa provenía de la degradación de la sacarosa se midieron los niveles del disacárido (Figura 15). Se encontró que tanto a las 0 como a las 4 h no hay diferencias significativas en los contenidos de sacarosa ($F(2,30)=1.62$; $p=0.212$).

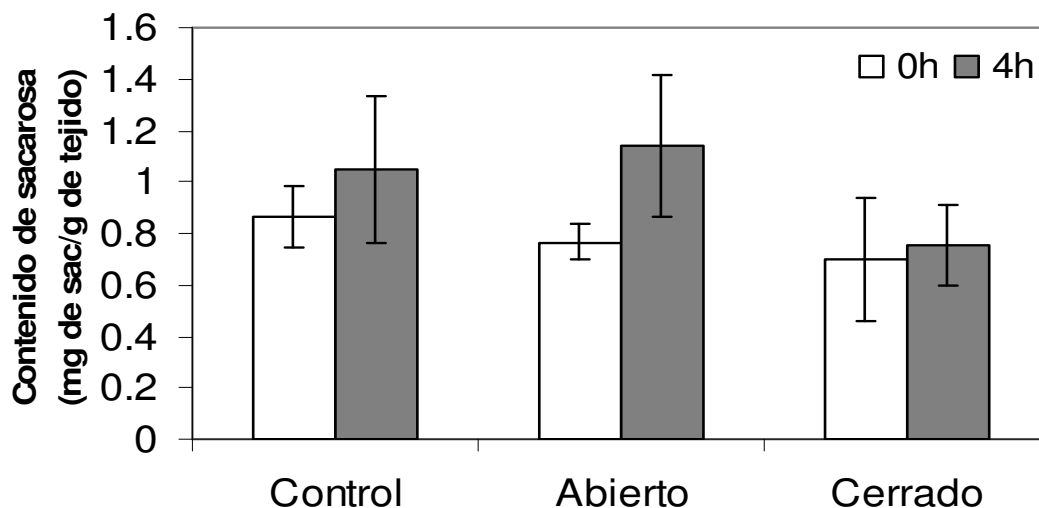


Figura 6. Contenido de sacarosa en semillas de *O. tomentosa* sometidas a priming natural cerrado y abierto. La sacarosa se determinó por un método enzimático según se describió en materiales y métodos. Cada punto corresponde a la determinación del carbohidrato en dos lotes de semillas germinadas independientemente y cada muestra realizada por cuadruplicado. Datos expresados en medias \pm error estándar.

El contenido de cada uno de los carbohidratos es producto del balance entre su síntesis y degradación. En el caso de la sacarosa observamos que este se encuentra en equilibrio, pero en fructosa no. Es probable que las semillas tengan un atraso en el uso de la fructosa, o bien que las semillas sometidas al tratamiento con priming se encuentren adelantadas en su uso.

Una de las reservas de carbohidratos que se movilizan en etapas tardías de la germinación y de manera mayoritaria durante el periodo post-germinativo es el almidón, examinamos el perfil del carbohidrato, ya que las semillas de *Opuntia* ya han comenzado con la elongación de la semilla en los lotes que fueron sometidos al priming natural.

Se encontró que el control presenta más almidón al tiempo cero que las semillas que fueron tratadas con el priming natural, diferencia que es significativa ($F(2,30)=5.47$; $p=0.009$). Lo que indica que durante el priming las semillas iniciaron la movilización del almidón. Un dato que corrobora lo anterior, es que a las 4 h de imbibición las semillas

control presentan un contenido de almidón similar al encontrado a las 0 h de las semillas tratadas (Figura 16).

La imbibición por 4 h en las semillas con priming no provoca cambios similares, ya que en el lote de semillas con priming abierto no hay cambio en el contenido de almidón, mientras que en el lote de semillas con priming cerrado el almidón continuó reduciéndose, 2.1 veces menos que a 0 h. Una explicación es que durante el priming se encuentren en estadios diferentes del desarrollo y que la imbibición por 4 h aumente éstas diferencias, como se mostró en la Figura 12.

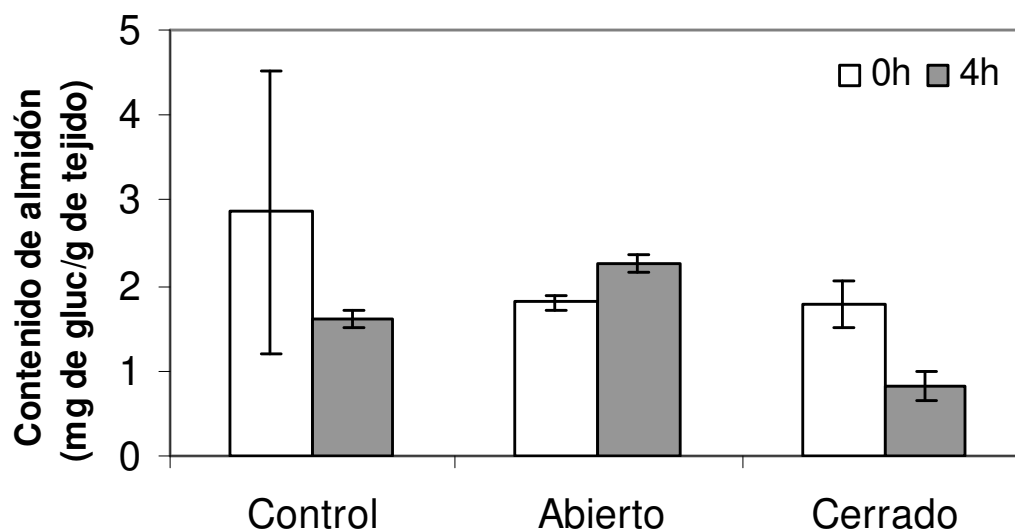


Figura 7. Contenido de almidón en semillas de *O. tomentosa* sometidas a priming natural cerrado y abierto. El almidón se gelatinizó durante 4 h a 90°C y posteriormente se degradó en una solución de aminoglucosidasa de *Aspergillus niger* la cual se incubó toda la noche a 37°C, y la glucosa resultante se determinó por un método enzimático según describió en materiales y métodos. Cada punto corresponde a la determinación del carbohidrato en dos lotes de semillas germinadas independientemente y cada muestra realizada por cuadruplicado. Datos expresados en medias \pm error estándar.

Otra de las formas de reserva de carbono de la semilla son los lípidos, por lo que se analizó si estos se movilizaban de manera diferente entre las semillas control y las que fueron sometidas a los tratamientos (Figura 17).

Los lípidos son una reserva que se degrada al iniciar la germinación y en el lote control se observó claramente que de las 0 a las 4 h hay una disminución en su contenido, 49.6

% menos. En los lotes de semillas que fueron sometidos a priming se encontró que al tiempo cero contienen un contenido de lípidos semejante al del tiempo 0 del control, pero a las 4 h encontramos dos comportamientos, nuevamente uno para el tratamiento en abierto y otro para el cerrado.

En el tratamiento en abierto hay un aumento a las 4 h de imbibición de 1.8 veces respecto al tiempo cero, la acumulación no nos indica que se están acumulando más lípidos de reserva, sino que es posible que haya mayor contenido de membranas o células en el tejido, como se observó en la Figura 12.

En cuanto al contenido de lípidos en el priming en cerrado se encontró que no hay diferencia entre las 0 y 4 h de germinación, es probable que ahora la degradación de lípidos no sea tan importante o bien que el recambio entre lípidos de reserva a lípidos de membrana se encuentre en equilibrio. Aunque para comprobar lo anterior sería necesario determinar los lípidos membranales en los tres lotes.

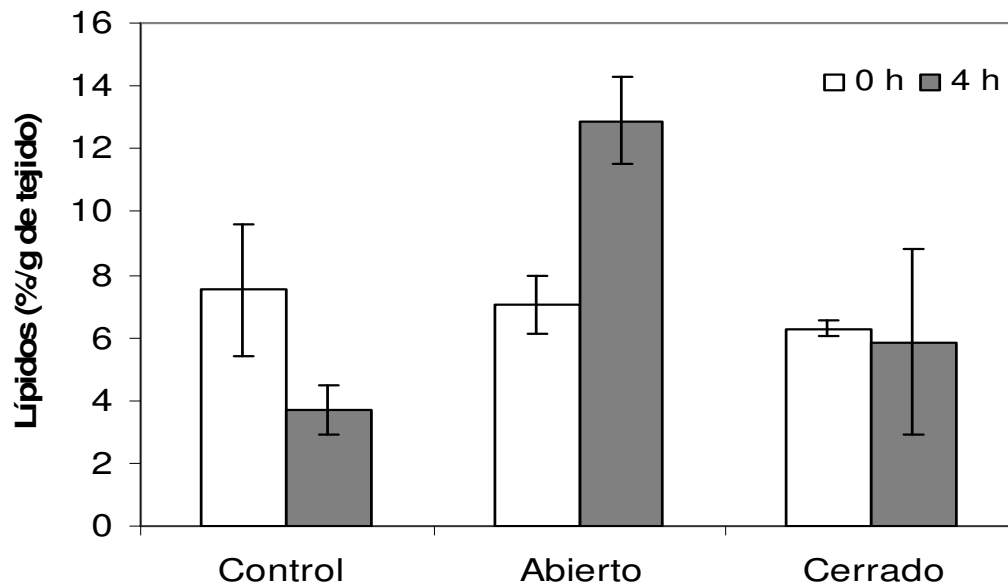


Figura 8. Contenido lípidos a 0 y 4 h de germinación de las semillas de *O. tomentosa* sometidas a dos diferentes tratamientos de priming natural. Se extrajeron los lípidos totales con una mezcla cloroformo-metanol y se determinó por diferencia de peso el contenido total de lípidos. La determinación se realizó por duplicado. En el perfil de lípidos se encontró que si hay diferencias significativas entre los tratamientos ($F(2,6)=8.61$; $p=0.017$)

Por lo anterior, se analizaron por medio de una cromatografía en capa fina la composición de los lípidos en cada uno de los extractos. De una misma muestra se pueden separar los lípidos neutros de los polares y para su identificación se realizan dos diferentes tipos de tinciones, en la Figura 18 se muestran los dos tipos de tinción o revelado que se utilizaron para la identificación y visualización de los ácidos grasos neutros y fosfolípidos presentes en los extractos lipídicos de nuestras muestras (control, abierto y cerrado) para 0 y 4 h de germinación.

Como se describe en materiales y métodos, se corrieron curvas patrón con estándares de triacilglicerol (TAG), ácido oleico (OA), diacilglicerol (DAG), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilcolina (PC) en placas de TLC, se obtuvieron sus R_f 0.93, 0.87, 0.70, 0.38 y 0.13 respectivamente, mismos que fueron utilizados para la identificación de los lípidos específicos en cada una de las muestras.

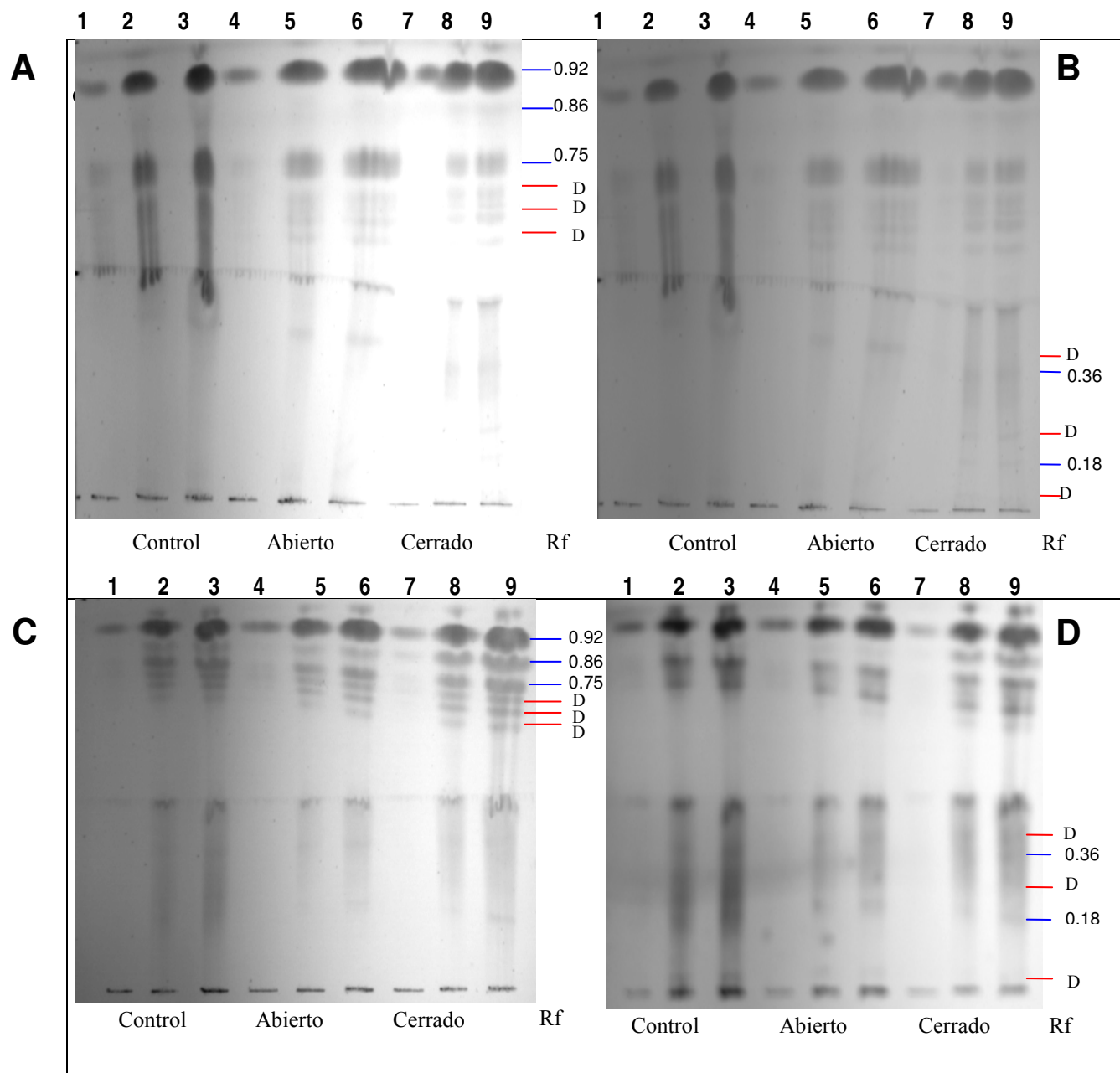


Figura 9. Determinación de ácidos grasos y fosfolípidos en extractos lipídicos obtenidos de los tres lotes de semillas de *O. tomentosa* germinadas 0 y 4 h. Se extrajeron los lípidos y se aplicaron a las placas de TLC, se corrieron utilizando dos diferentes fases móviles según se describe en materiales y métodos. En el cromatograma **A**, y **B** corresponden a las muestras de lípidos a 0 h que muestra (en los carriles 1, 4, 7. – 2, 5, 8 y 3, 6, 9) la aplicación del equivalente a 0.5, 5 y 9 μ L mientras que **C** y **D** corresponden a las muestras de 4 h que muestra (en los carriles 1, 4, 7. – 2, 5, 8 y 3, 6, 9) la aplicación del equivalente a 0.5, 5 y 9 μ L de muestra. Las placas se revelaron primero con yodo (figura 18A y 18C) en donde se encuentran los ácidos grasos y después con molibdeno (figura 18B y 18D) en donde se revelan los fosfolípidos.

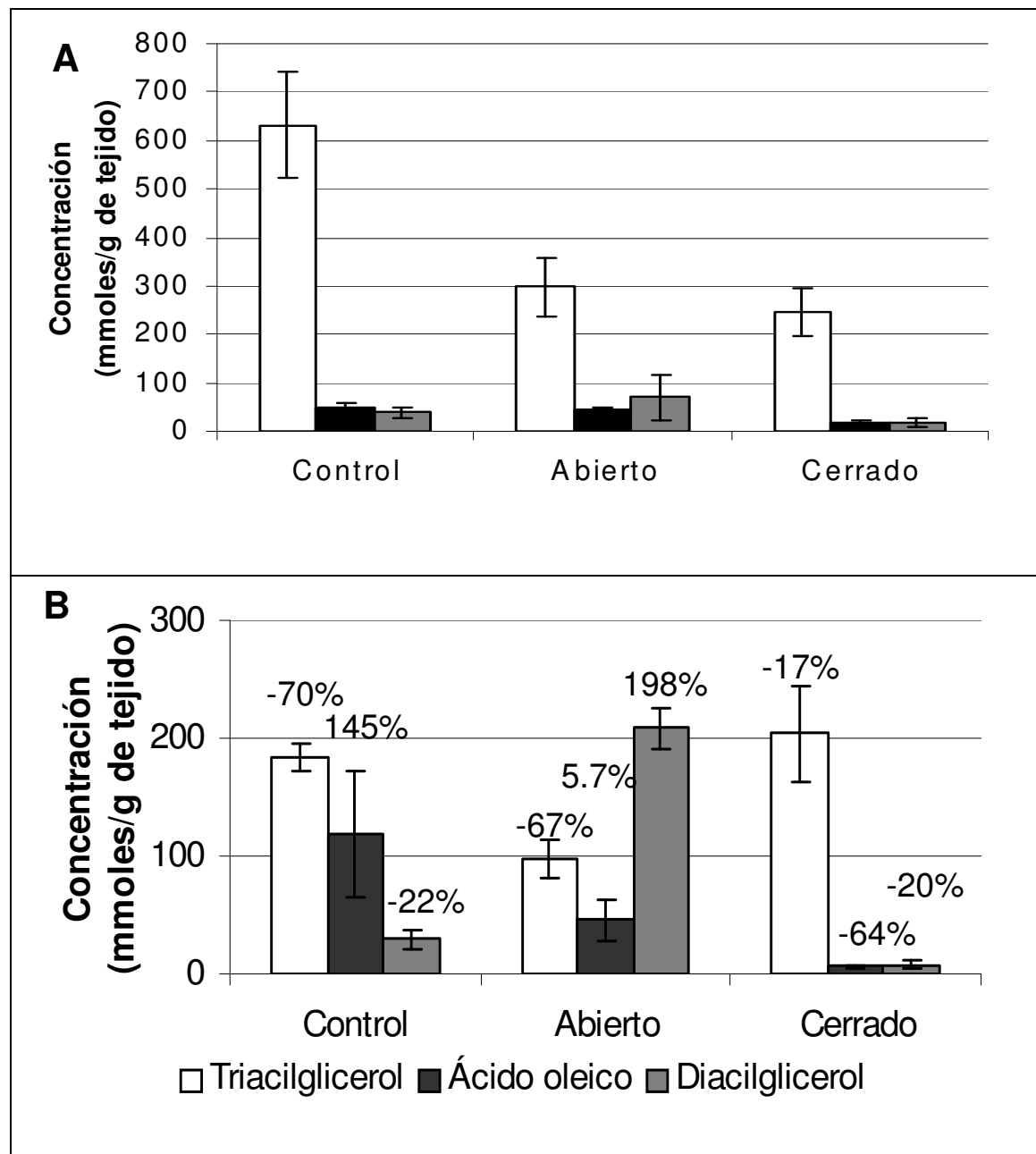


Figura 10. Contenidos de TAG, AO y DAG de las semillas secas y germinadas 4 h de *O. tomentosa* sometidas a dos diferentes tratamientos de priming natural. **A)** semillas secas, **B)** semillas germinadas. Sobre la barra del contenido de lípido se encuentra el porcentaje del cambio de ese lípido al pasar de 0 a 4 h de germinación.

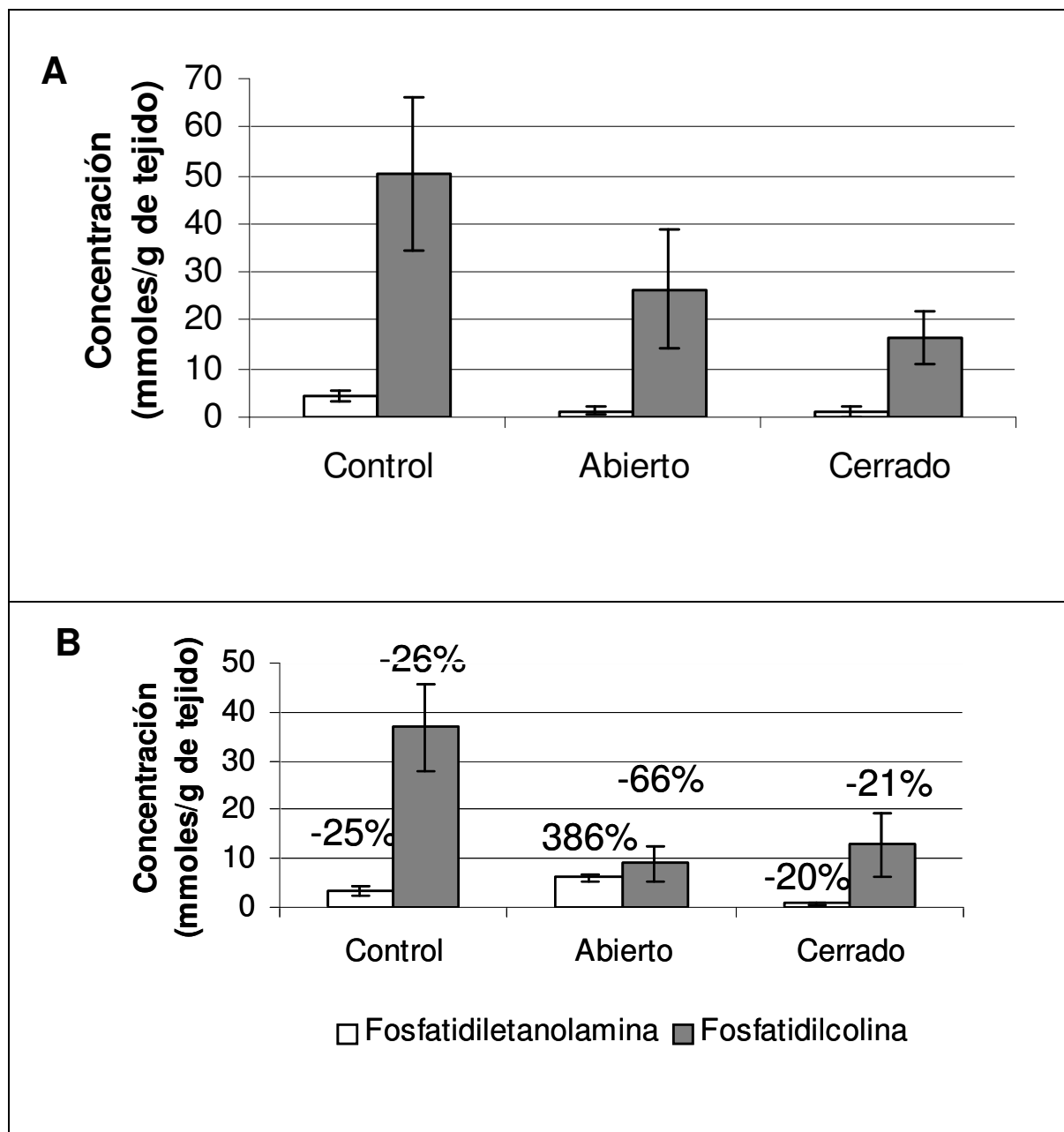


Figura 11. Contenidos Fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina de semillas secas y germinadas 4 h de *O. tomentosa* sometidas a dos diferentes tratamientos de priming natural. **A)** semillas secas, **B)** semillas germinadas. Sobre la barra del contenido de lípido se encuentra el porcentaje del cambio de ese lípido al pasar de 0 a 4 h de germinación.

Se obtuvieron las densitometrías de los cromatogramas de las muestras y con estos datos y los de las densitometrías de los estándares, se calcularon los mmoles de cada lípido/ g muestra examinada (Figuras 19 y 20).

Las semillas control a cero horas de imbibición presentaron el mayor contenido de TAG, concuerda con que el principal lípido de reserva en las semillas sean los TAG. Las semillas que pasaron por los tratamientos de priming abierto o cerrado presentaron contenidos menores al control (Figura 19A). Lo anterior indica que la movilización de lípidos comenzó durante el proceso de priming. Por otro lado, los lípidos que le siguen en abundancia a la semilla control es el diacilglicerol y el ácido oleico. En las semillas que pasaron por los tratamientos de priming también TAG, DAG y AO muestran el mismo patrón de abundancia en las semillas control, aunque en todos los casos el contenido es menor.

Los lípidos menos abundantes en la semilla de *Opuntia* son los fosfolípidos, determinamos PE y PC y encontramos que en las semillas con priming se redujo su contenido (Figura 20A).

Cuando las semillas se embebieron por 4 h, se observa que el patrón de lípidos cambia (Figura 19B y 20B). Los TAG disminuyen en los tres lotes de semillas, 70, 67 y 70% en las semillas control, priming abierto y cerrado, respectivamente. Sin embargo, a pesar de los diferentes porcentajes de decremento en los TAG, todos los lotes de semillas llegan a un contenido similar, ya que las diferencias no son significativas tanto en control como abierto aunque ligeramente en el cerrado (Figura 19B). Un cambio que es importante de señalar de las 0 a las 4 h de imbibición, es el contenido de DAG, ya que es muy diferente en los tres lotes, baja en el control (22% menos), se incrementa en el abierto (198% más) y sin cambio significativo en el cerrado, patrón de abundancia que se asemeja al que observamos cuando se midieron los lípidos totales en las semillas (Figura 17) y que podemos reproducir cuando hacemos la sumatoria de los 5 lípidos determinados mediante la cromatografía de capa fina (Figura 21).

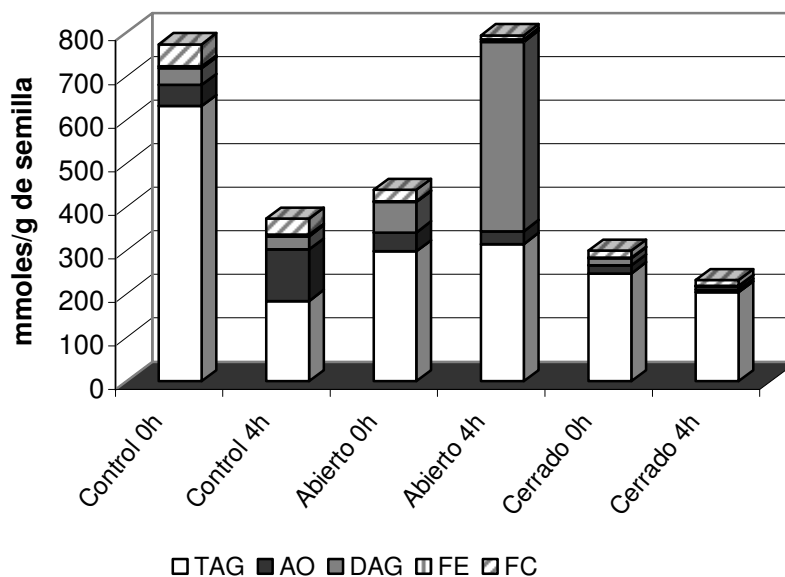


Figura 12. Contenido acumulado de los 5 lípidos detectados en las semillas de *Opuntia tomentosa* sometidas a dos tratamientos de priming natural.

La abundancia relativa de los DAG depende de cuanto TAG se está hidrolizando, pero también de la velocidad de uso de los DAG para formar ácidos grasos libres y conducirlos hasta la formación de Acetil-CoA. En cuanto a uno de los ácidos grasos que se logró determinar el AO, obtuvimos que a las 4 h la semilla control tiene 145% más que el que tenía a las 0 h, mientras que en las semillas con tratamiento si disminuyo pero menos, aunque hay que recordar que a las 0 h tenían un contenido menor de AO (Figura 19B).

Con respecto a los fosfolípidos las semillas control ambos fosfolípidos tanto para la fosfatidiletanolamina (PE) como para la fosfatidilcolina (PC) se redujeron un 25 y 26% respectivamente (Figura 20B), lo que sugiere que estos lípidos se están removiendo para reparar las membranas celulares. Mientras que, para las semillas con priming abierto la PE aumento 386% y PC disminuyo 66%, y en las semillas del lote con tratamiento de priming cerrado disminuyeron ambos fosfolípidos 20 y 21% respectivamente. Recordemos que en priming abierto se observa a las 4 h que hay elongación de la radícula, lo cual nos indica que hay más superficie membranal y por

tanto podría explicar el hecho de encontrar un contenido mayor de alguno de los fosfolípidos. Incremento en la superficie membranal que también está ocurriendo en el tratamiento de priming en cerrado pero en menor abundancia, ya que la elongación es menor, sin embargo también es probable que todavía se encuentre en fase de reparación membranal.

De los metabolitos analizados, encontramos que es probable que la movilización de sacarosa haya sido afectada ya que observamos una acumulación en la fructosa, pese a no observar un incremento en el contenido de sacarosa, sin embargo al observar cambios en el patrón de los lípidos, también sugiere que éstos se están activamente degradando para sintetizar sacarosa y nutrir al embrión. También es probable que las vías de degradación del almidón ya se encuentren activas, puesto que encontramos una disminución en el contenido de almidón en las semillas tratadas.

Efecto del “priming” natural en enzimas claves del metabolismo de carbono de semillas de *O. tomentosa*.

Debido a que la cantidad de semillas era poca y a que había varias vías metabólicas que podían encontrarse afectadas durante el priming natural de *O. tomentosa*, se decidió determinar la actividad enzimática *in situ*, mediante una técnica reportada recientemente, en la que los autores detectaron la actividad de 18 enzimas en embriones en desarrollo de *Arabidopsis thaliana* (Baud y Graham, 2005).

Todas las actividades enzimáticas que se determinaron en *O. tomentosa* se acoplaron o terminaron con la producción de NADH o NADPH, los cuales redujeron al azul de nitrotetrazolio a su sal, el formazan. De tal manera que la actividad se observó como los cambios en la intensidad del azul que aparecía en los embriones. Se utilizaron para cada determinación al menos 6 embriones, 3 en donde se desarrollo el color con toda la mezcla de reacción enzimática y otros 3 que denominamos blancos y en donde no se colocó el sustrato de la enzima o el NAD⁺ o NADP⁺.

Detección in situ de la actividad de las invertasas ácidas y la Malato sintasa “in situ” en embriones de O. tomentosa.

En vista de que el contenido de fructosa aumentó en las semillas que pasaron por el priming natural, es probable que la tasa de degradación de la sacarosa haya cambiado, debido a esto exploramos a un conjunto de enzimas que participan en su utilización, las invertasas ácidas (Inv), en la célula hay dos diferentes, una localizada en la pared celular y la otra en la vacuola. Las invertasas hidrolizan a la sacarosa en sus dos hexosas, glucosa y fructosa (Roitsch y González, 2004). Considerando además, que las diferencias entre el control y los dos tratamientos de priming se presentan antes de ponerlas a embeber, se determinó la actividad enzimática en los embriones al tiempo cero.

La actividad de las Inv. en los tres lotes de embriones se monitoreo cada 30 minutos por 2.5 h. Se detectó que la tinción aparecía de manera gradual conforme avanza el tiempo y en zonas distintas del embrión. Para hacer más fácil la descripción y el análisis se trazó una línea imaginaria en los embriones, así se distinguen dos zonas, la I que corresponde a la zona de la radícula y la zona II que es en donde se encuentran los cotiledones (Figura 22).

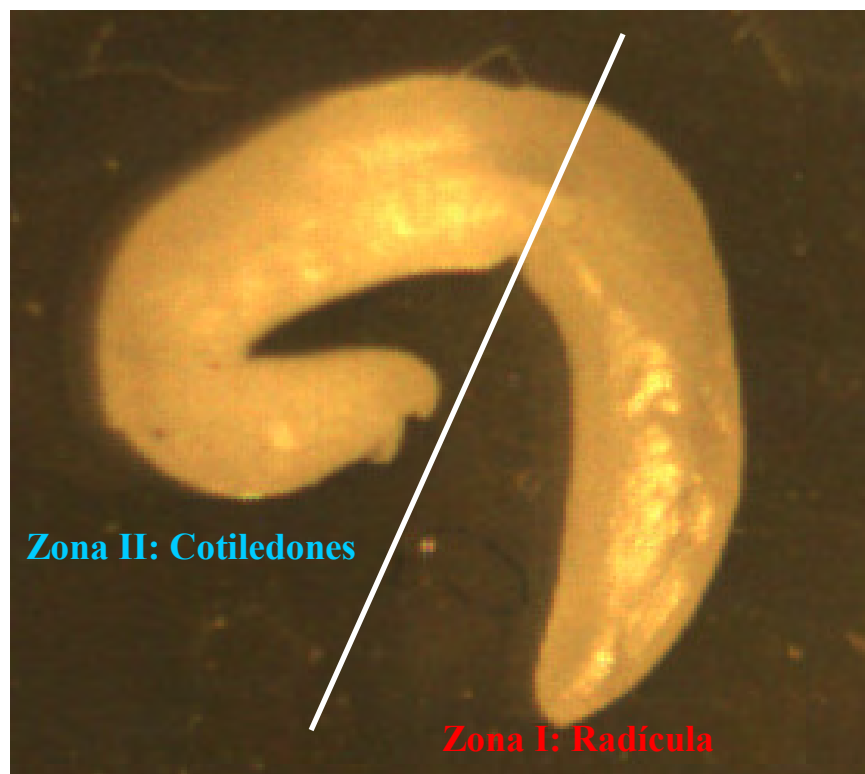


Figura 13. Embrión de *Opuntia tomentosa*. El embrión se fijó con 1ml de solución fijadora (2% paraformaldehído, 2% PVP-40 y 1mM de DTT, pH 7.0) a 4°C por 1 h. En el embrión se localizan las dos zonas específicas que se usaron para el análisis y descripción de la detección enzimática; la zona I corresponde a la radícula y la zona II que corresponde a los cotiledones.

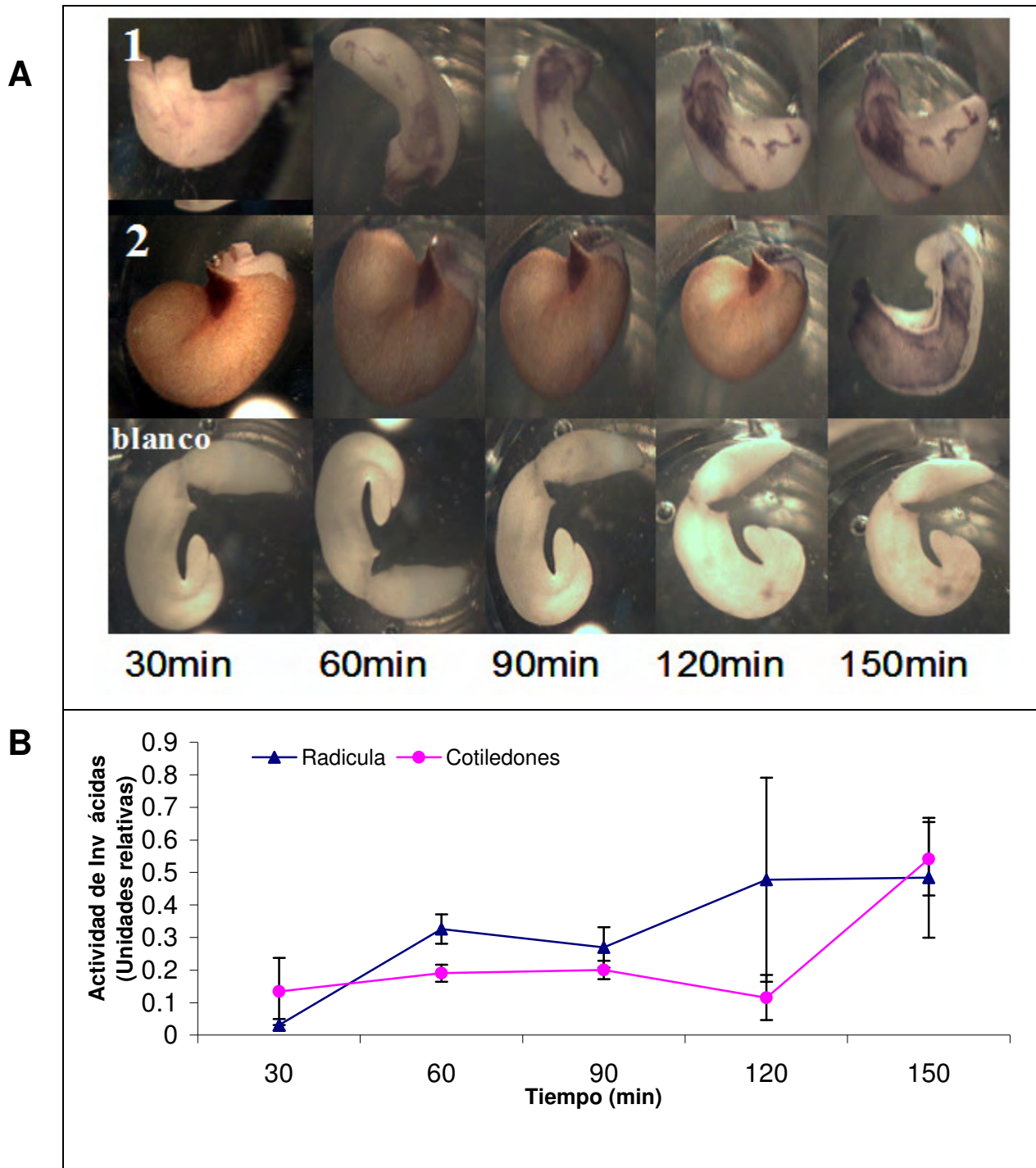


Figura 14. Detección *in situ* de la actividad de las Inv en los embriones de lote control de *O. tomentosa*.

Se extrajeron embriones de las semillas del lote control, se fijaron según se describe en materiales y métodos. Los embriones se colocaron en un medio de reacción para detectar la actividad de invertasa ácida y se monitoreo la aparición del color azul por 180 min. **A)** Se tomaron las fotos de los embriones y **B)** se obtuvo el curso de progreso de la reacción al determinar las intensidades de las manchas mediante el programa Motic Imágenes Plus 2.0 ML.

En la Figura 23 se muestra un panel representativo de la detección de actividad de las Inv, en donde se tienen dos embriones que fueron sometidos a un medio de reacción completo del lote control y un embrión marcado como blanco que se incubó en un medio de reacción sin el sustrato. Se observa que no hay actividad inespecífica en el blanco aún después de 150 min de reacción. Mientras, en los embriones en los que el medio estaba completo se detectó que en la zona de la radícula la tinción fue aumentando gradualmente desde los 60 min de reacción, aunque después de 120 min no continuó aumentando el color. La zona de los cotiledones, presentó coloración sólo en la región que delimita el floema y que aparece como una línea discontinua que parte del centro y va hacia la zona externa de los cotiledones, excepto para el embrión 2 en donde a las 2.5 h se encuentra todo teñido. Lo que hace diferente al embrión 2 es que desde inicio tenía muy adherido el pericarpio y que a las 2.5 h éste se desprendió, dejando expuesto al tejido embrionario al medio de reacción.

En cuanto a la actividad en los embriones sometidos al tratamiento de priming se encontró que en el caso del tratamiento en abierto (Figura 24), los embriones alcanzan una mayor tinción a los 60 min en la zona de la radícula respecto a las semillas control, 2 veces. En la zona de los cotiledones también comienza a teñirse a los 60 min pero permanece así durante los 150 min de reacción. En la serie de fotos del abierto se puede observar que conforme transcurre el tiempo de incubación tenemos que los embriones se están engrosando, haciéndose visible los dos cotiledones que componen al embrión, aunque no se siempre se veían en todos los embriones analizados.

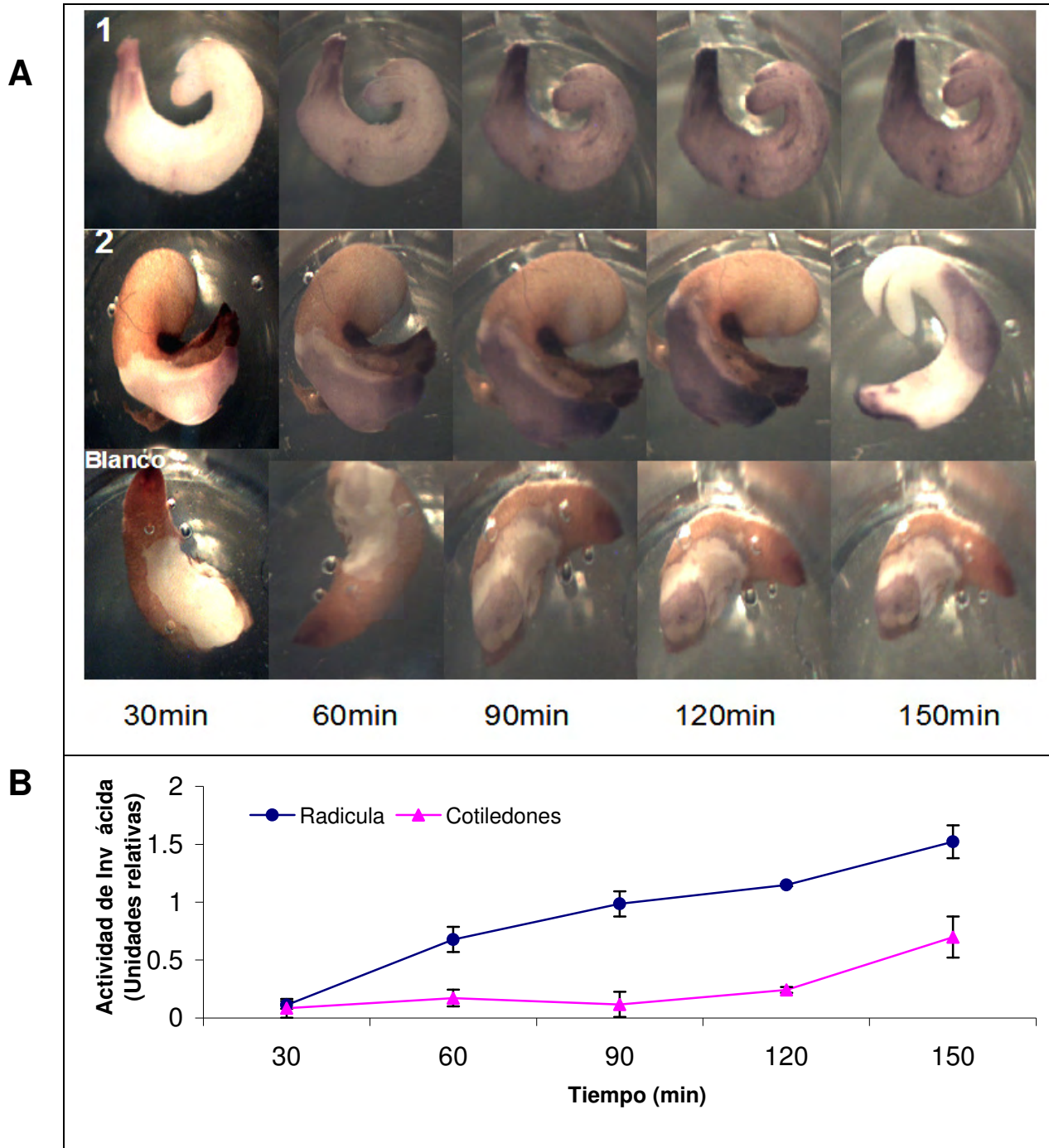


Figura 15. Detección *in situ* de la actividad de las Inv en los embriones de lote abierto de *O. tomentosa*.

Se extrajeron embriones de las semillas del lote abierto, se fijaron según se describe en materiales y métodos. Los embriones se colocaron en un medio de reacción para detectar la actividad de invertasa ácida y se monitoreo la aparición del color azul por 180 min. **A)** Se tomaron las fotos de los embriones y **B)** se obtuvo el curso de progreso de la reacción al determinar las intensidades de las manchas mediante el programa Motic Imágenes Plus 2.0 ML.

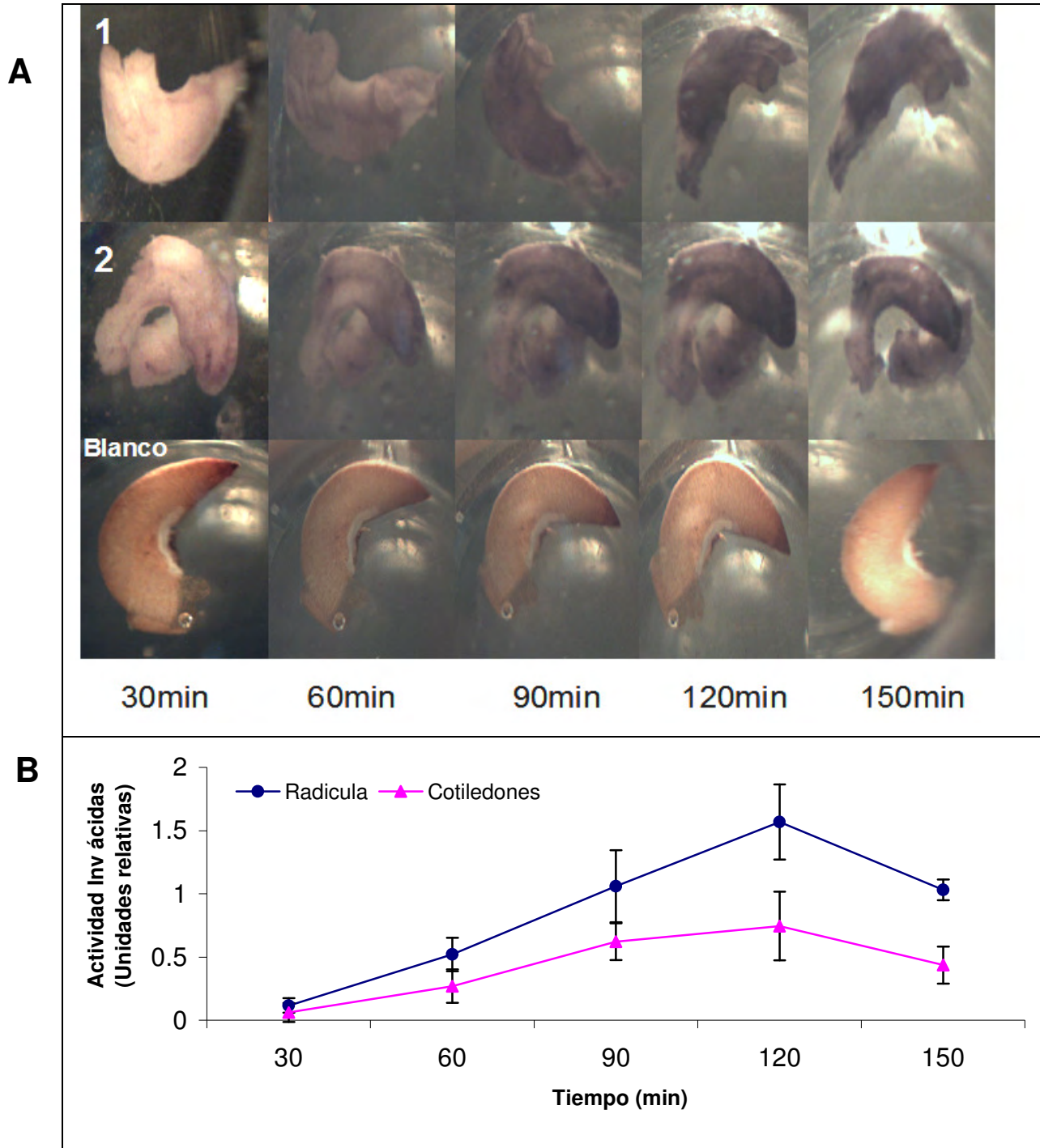


Figura 16. Detección *in situ* de la actividad de las Inv en los embriones de lote cerrado de *O. tomentosa*.

Se extrajeron embriones de las semillas del lote cerrado, se fijaron según se describe en materiales y métodos. Los embriones se colocaron en un medio de reacción para detectar la actividad de invertasa ácida y se monitoreo la aparición del color azul por 180 min. **A)** Se tomaron las fotos de los embriones y **B)** se obtuvo el curso de progreso de la reacción al determinar las intensidades de las manchas mediante el programa Motic Imágenes Plus 2.0 ML.

La actividad de invertasa de los embriones con priming en cerrado presentaron un patrón de actividad diferente al de los otros dos lotes de semillas, en este caso todo el embrión se comenzó a teñir desde los 60 min (Figura 25). Si bien ambas zonas se tiñeron gradualmente conforme avanzó el tiempo de reacción, su actividad a los 120 min fue ligeramente superior al que alcanzaron los embriones a los 30 min, como se aprecia en la curva comparativa de la Figura 26.

En resumen, la actividad de las invertasas ácidas en los embriones sujetos a priming natural se encuentra aumentada, aunque el tipo de tratamiento de priming produce efectos distintos en la localización de la actividad de invertasas. Actividad de invertasa similar en la zona de II o de los cotiledones en el tratamiento de priming en abierto respecto al control (0.004 y 0.0047 Unidades relativas min^{-1} , abierto y control, respectivamente) y una aparición temprana y mayor de actividad en el tratamiento de priming cerrado, con una actividad de 0.24 Unidades relativas min^{-1} . Mientras que en las raíces los dos tratamientos de priming natural produjeron una aparición temprana de actividad de invertasa, con actividades de 0.34 y 0.49 unidades relativas min^{-1} , abierto y cerrado respectivamente (Figura 26). Actividad de 2.6 a 3.7 mayor a la encontrada en los embriones control en la zona de la radícula.

Los tejidos que se denominan demandantes de nutrimentos como las raíces se ha sugerido que tienen esa capacidad debido a que la hidrólisis de la sacarosa produce una disminución en la concentración de la sacarosa circundante por lo que llama o jala más sacarosa de los tejidos fuente (Roitsch y González, 2004), es probable que al estar aumentado el metabolismo en las semillas que fueron sometidas al priming, la raíz este necesitando del aporte de mayor cantidad de carbohidrato para aumentar su crecimiento.

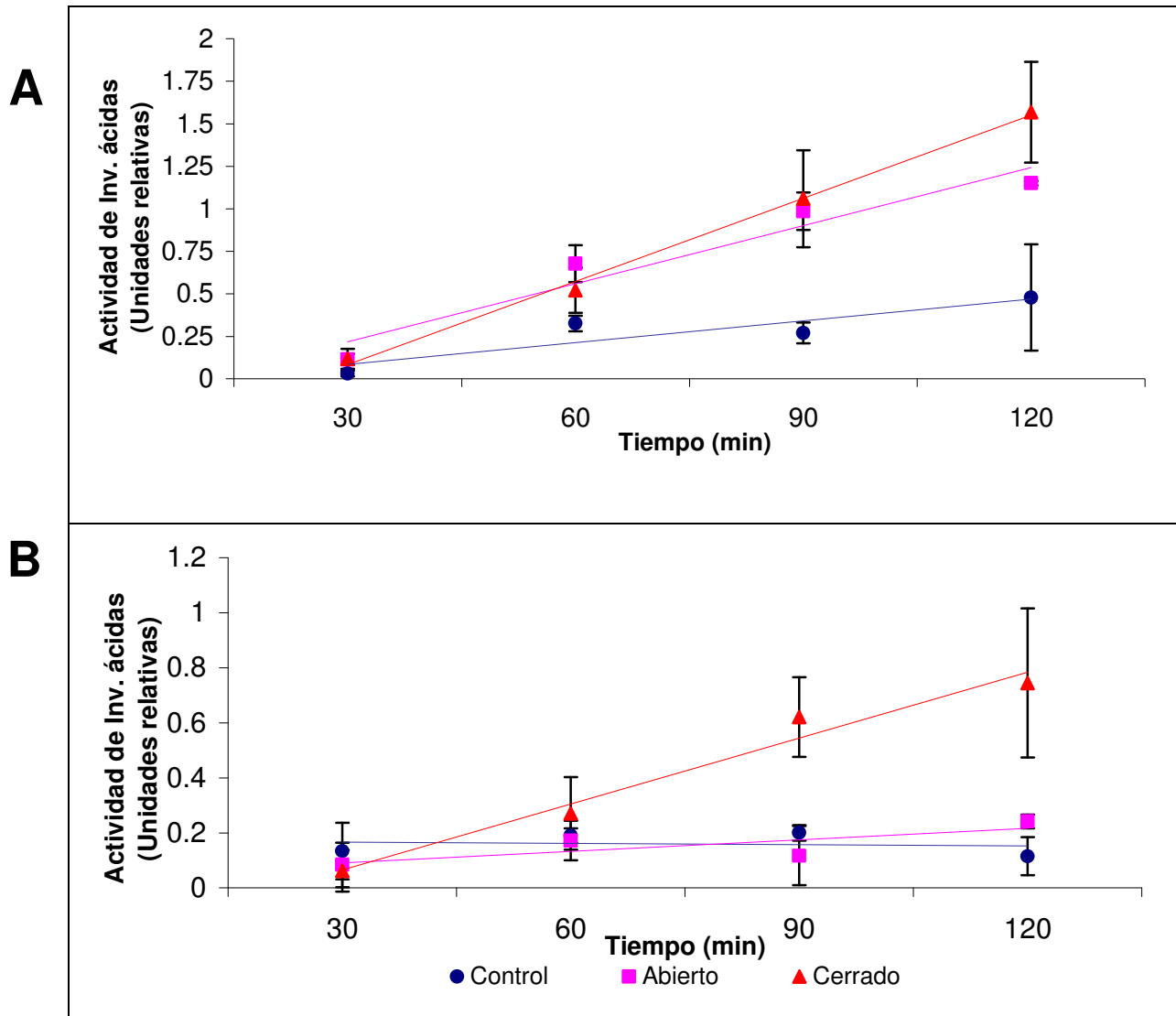


Figura 17. Curso temporal de actividad de las Inv. en los tres lotes de semillas de *O. tomentosa*, control, cerrado y abierto. A. Radícula del embrión y B. Cotiledones del embrión.

Detección de la actividad de la malato sintasa en embriones sin embeber de O. tomentosa sometida a dos diferentes tratamientos de priming natural.

Como se mencionó anteriormente el catabolismo de la sacarosa se encuentra afectado en las semillas que fueron sometidas a priming natural, se adelantaron en la actividad de sus invertasas ácidas, pero no observamos que el contenido de sacarosa cambie, por lo que es probable que el anabolismo este participando en ese equilibrio. Una de las vías metabólicas que puede comenzar a funcionar durante el priming natural es el ciclo del glioxilato, ya que las semillas son capaces de degradar los lípidos y estos proporcionarán esqueletos carbonados para la formación de carbohidratos, para la nutrición de la semilla en crecimiento. Dos son las enzimas clave en el ciclo del glioxilato, la isocitrato liasa y la malato sintasa (Eastmond y Graham, 2001), así que en este trabajo se determinó una de ellas, la malato sintasa.

La actividad de la MS en los embriones control comenzó a observarse a partir de los 20 min, aunque sólo en zonas discretas de la radícula cercanas a la parte media del embrión y aumentó su intensidad gradualmente hasta los 50 min, se alcanzó a ese tiempo 2.9 veces más actividad respecto a los 20 min. Mientras que en la zona de los cotiledones se observa una tinción más homogénea que la de la radícula y también aumenta conforme avanza el tiempo de reacción, de los 20 hasta los 50 min la actividad es 6.8 veces mayor (Figura 27). El blanco nuevamente no presento tinción.

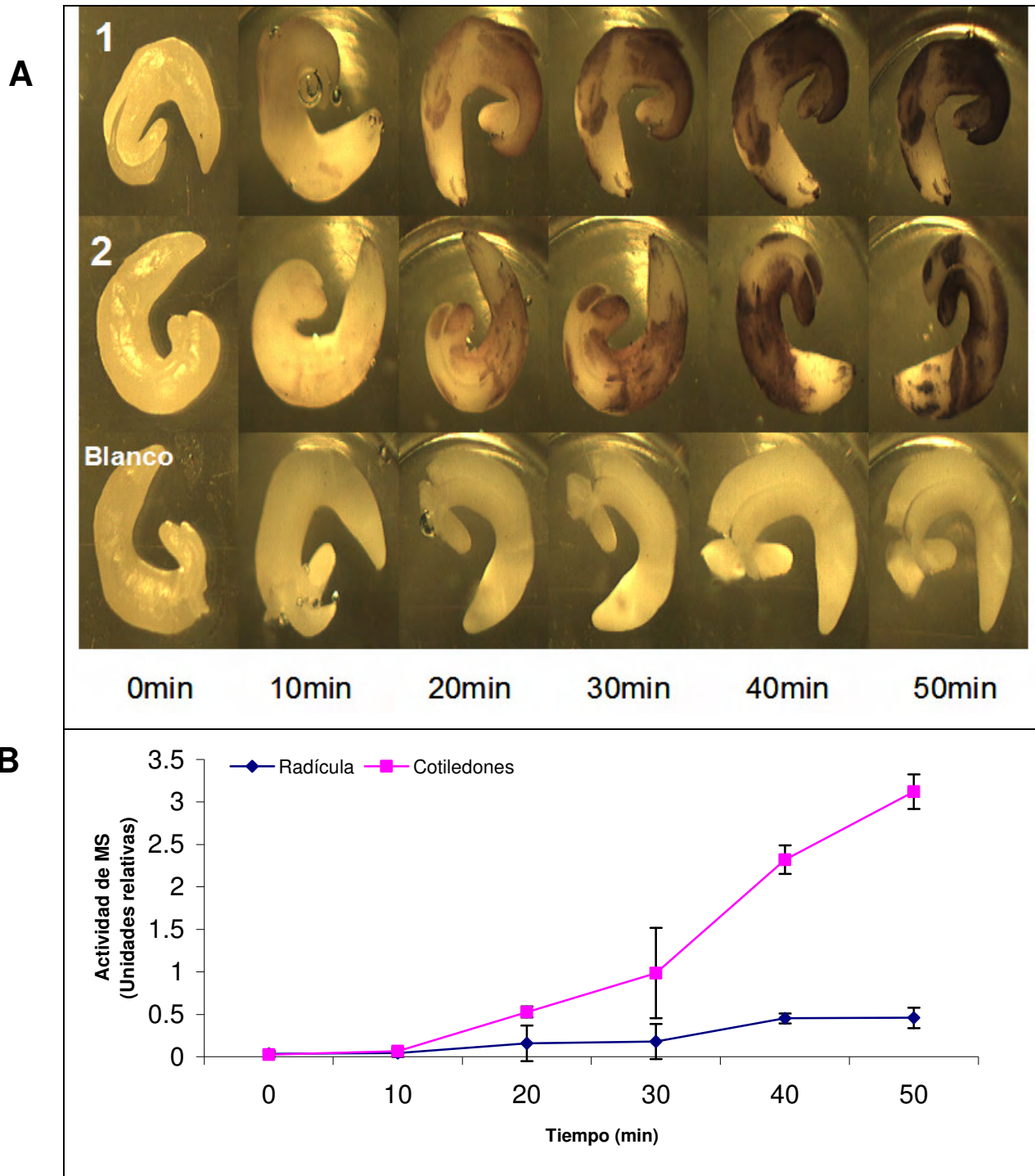


Figura 18. Detección *in situ* de la actividad de la MS en embriones de *Opuntia tomentosa* lote control.

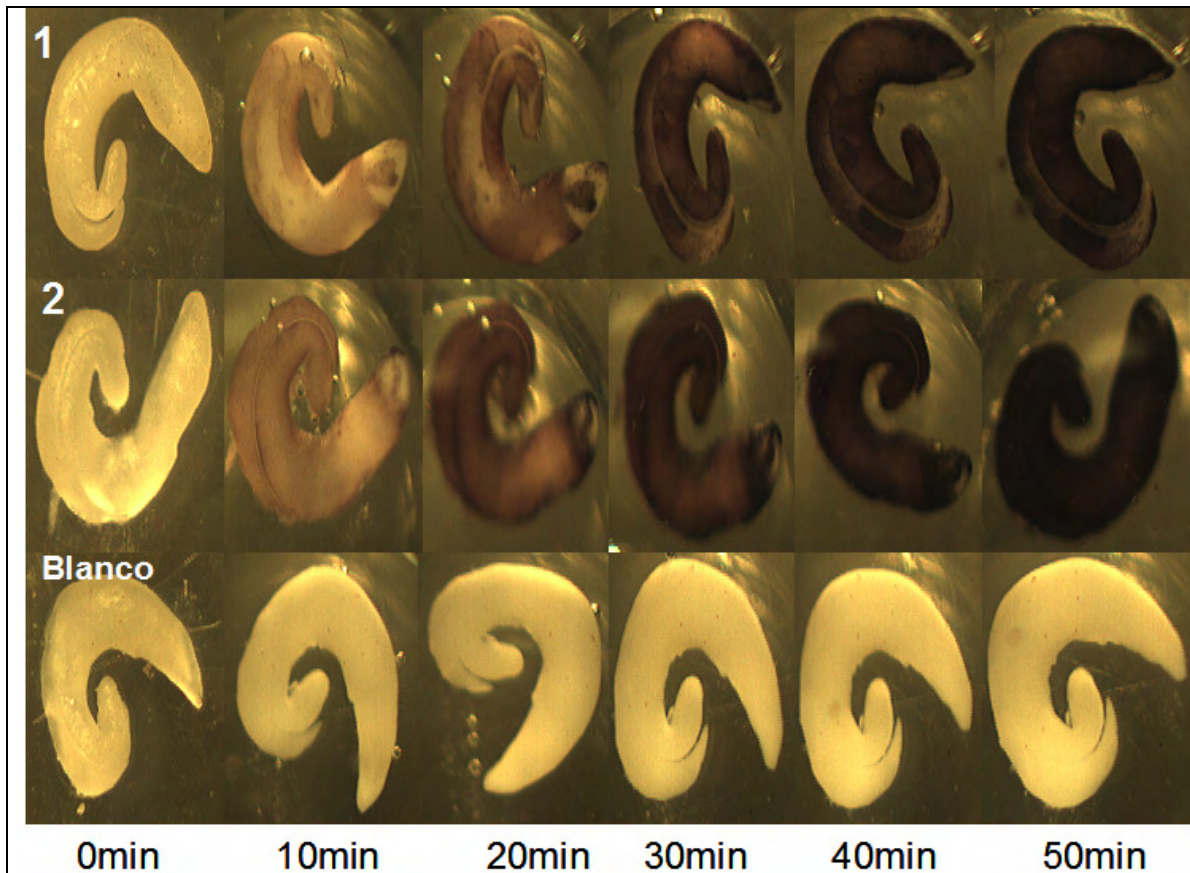
Se extrajeron embriones de semillas del lote control y se fijaron según se describe en materiales y métodos. Los embriones se colocaron en un medio de reacción para detectar la actividad de la MS y se monitoreo la aparición del color azul por 50 min. **A)** Se tomaron las fotos de los embriones y **B)** se obtuvo el curso de progreso de la reacción al determinar las intensidades de las manchas mediante el programa Motiic Imágenes Plus 2.0 ML.

Respecto a la actividad de la MS en los embriones que pasaron por los dos tratamientos de priming natural, encontramos que en ambos la actividad es más homogénea y más intensa que los embriones del lote control (Figuras 28 y 29). Sin embargo existen diferencias entre los niveles de actividad de ambos lotes con tratamiento, así como entre las dos zonas del embrión.

La actividad en los embriones que pasaron por el tratamiento de priming natural en abierto comenzó a los 10 min de reacción y su actividad es mayor en la zona de los cotiledones que en la zona de la radícula (zona I), por ejemplo al tiempo 50 min la zona II presenta 1.5 veces más que en la zona I (Figura 28). Lo anterior confirma que el embrión está activamente sintetizando sacarosa.

Mientras que en los embriones que pasaron por el priming natural en cerrado se encontró que la actividad también es visible a partir de los 20 minutos de reacción (Figura 29), homogénea en todo el embrión (Figura 29A), pero poco intensa.

A



B

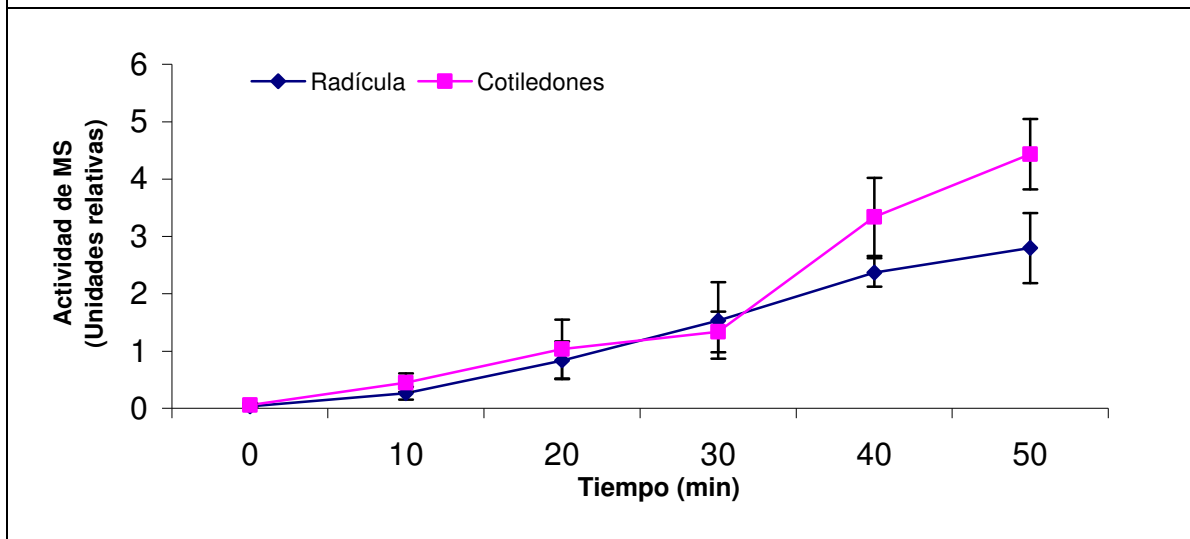


Figura 19. Detección *in situ* de la actividad de la MS en embriones de *Opuntia tomentosa* lote abierto.

Se extrajeron embriones de semillas del lote abierto y se fijaron según se describe en materiales y métodos. Los embriones se colocaron en un medio de reacción para detectar la actividad de la MS y se monitoreo la aparición del color azul por 50 min. **A)** Se tomaron las fotos de los embriones y **B)** se obtuvo el curso de progreso de la reacción al determinar las intensidades de las manchas mediante el programa Motic Imágenes Plus 2.0 ML.

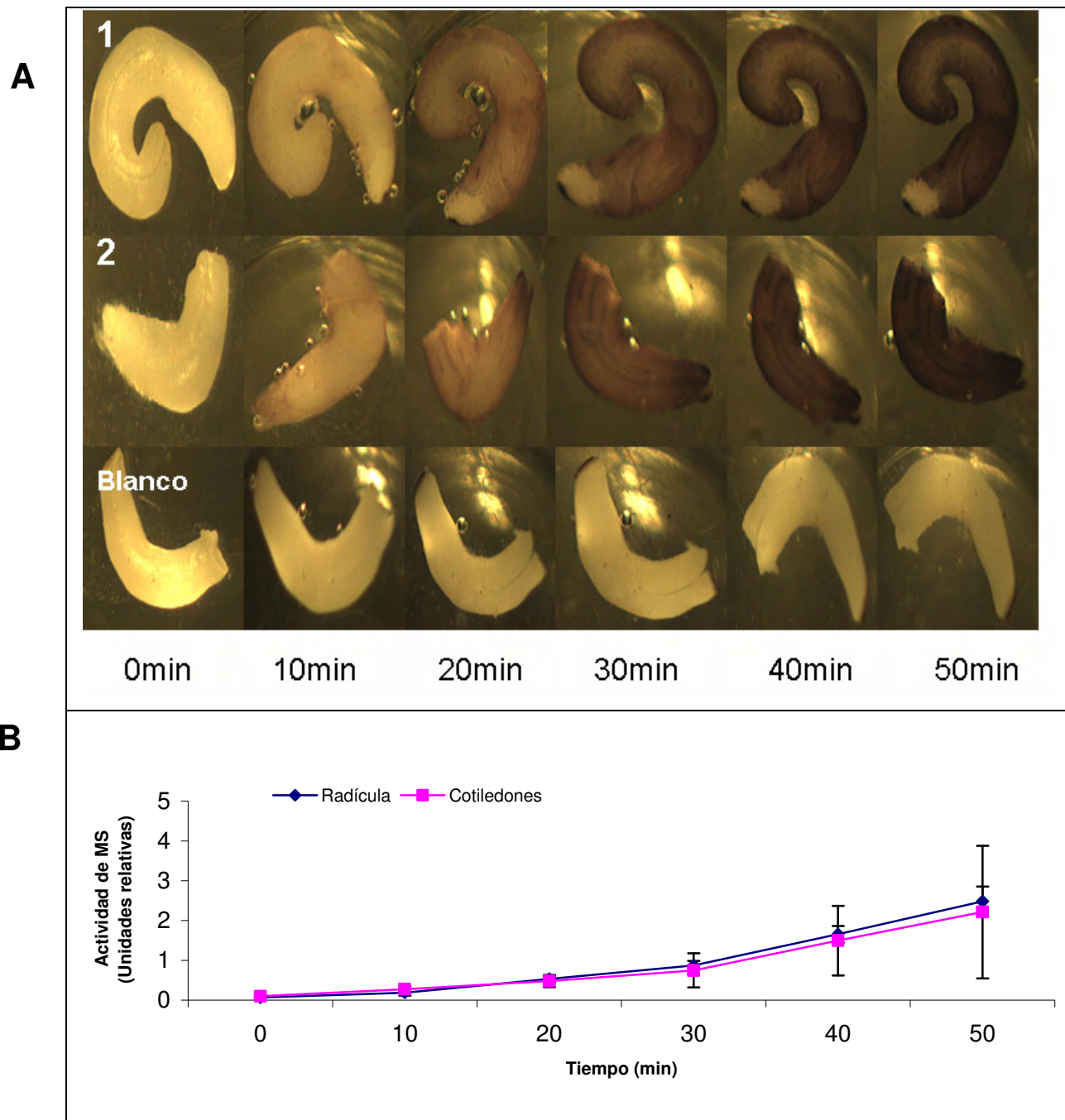


Figura 20. Detección *in situ* de la actividad de la MS en embriones de *Opuntia tomentosa* lote cerrado.

Se extrajeron embriones de semillas del lote cerrado y se fijaron según se describe en materiales y métodos. Los embriones se colocaron en un medio de reacción para detectar la actividad de la MS y se monitoreó la aparición del color azul por 50 min. **A)** Se tomaron las fotos de los embriones y **B)** se obtuvo el curso de progreso de la reacción al determinar las intensidades de las manchas mediante el programa Motic Imágenes Plus 2.0 ML.

Las curvas comparativas de progreso de reacción muestran que la actividad de la malato sintasa es diferente en los tres lotes de embriones examinados (Figura 30). La zona que presenta las mayores diferencias es la de la radícula o zona I en la que el tratamiento de priming en abierto presenta una mayor actividad que la que presentan el control y el priming en cerrado, 6.1 veces y 1.2 veces más actividad, respectivamente.

En la zona de los cotiledones el tratamiento de priming en abierto también presenta la mayor actividad, con un aumento en la actividad de la MS de 1.4 veces respecto al lote de embriones control. Lo anterior concuerda con que la actividad de la enzima puede funcionar para suministrar esqueletos carbonados a los cotiledones y propiciar su expansión.

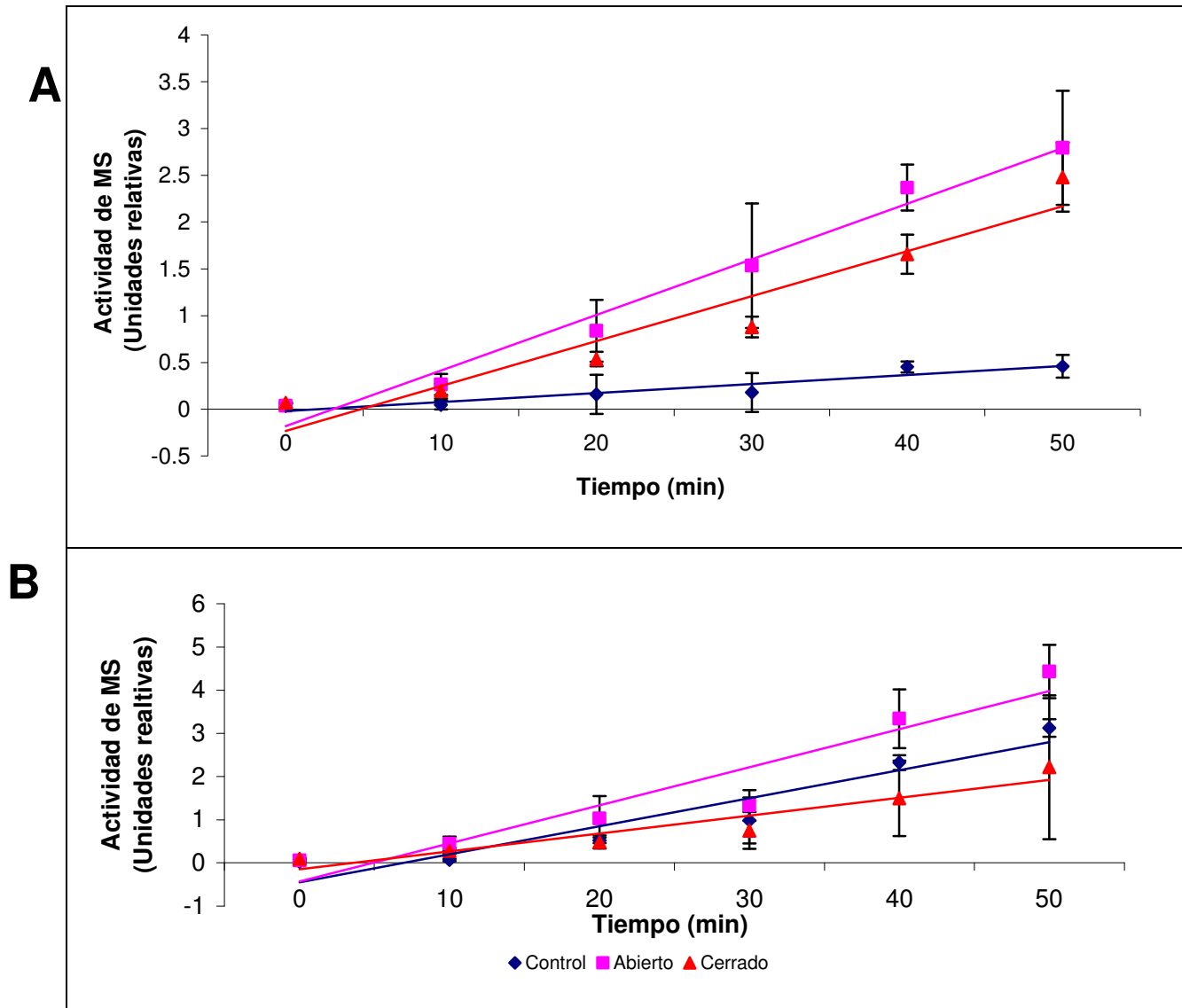


Figura 21. Curvas temporales de actividad de MS de embriones sin embeber provenientes de semillas de *O. tomentosa* sometidas a priming natural. **A.** Zona radicular y **B.** zona cotiledones. Se calculo la actividad de la MS a partir de los datos de regresión lineal de cada curva encontrándose que la actividad de la MS para la zona de la radícula es de 0.09, 0.59 y 0.48 unidades relativas min^{-1} para el lote control, abierto y cerrado respectivamente. Y para la zona de los cotiledones es de 0.64, 0.88 y 0.41 Unidades relativas min^{-1} para el lote control, abierto y cerrado, respectivamente.

Detección de la actividad de la malato sintasa en embriones embebidos de *O. tomentosa* sometida a dos diferentes tratamientos de priming natural.

Debido a que a las cuatro horas de germinación se observa que hay una degradación activa de los lípidos en las semillas sometidas a algún tipo de priming con respecto a las semillas control, se determinó la actividad de la MS a las 4 h.

La actividad de la MS comenzó a los 20 min para los embriones control, teniendo una tinción homogénea pero poco intensa. La actividad fue similar tanto para la zona de la radícula como en los cotiledones, 1.8 y 1.05 Unidades relativas min^{-1} , respectivamente (Figura 31).

La actividad para los embriones que fueron sometidos al priming natural abierto comenzó a los 10 min, la zona radicular del embrión presentó 2.3 veces más actividad que la zona de los cotiledones, aunque a los 50 min ambas zonas llegaron a una actividad similar de 3.74 unidades relativas min^{-1} (Figura 32).

Para los embriones que fueron sometidos al priming cerrado, la actividad de la MS se detectó desde los 10 min de reacción en ambas zonas del embrión y fueron gradualmente aumentando conforme avanzaba el tiempo de reacción. Ambas zonas presentaron perfiles similares de actividad y tuvieron un comportamiento similar durante todo el tiempo de reacción, alcanzando su máxima actividad a los 50 min (Figura 33).

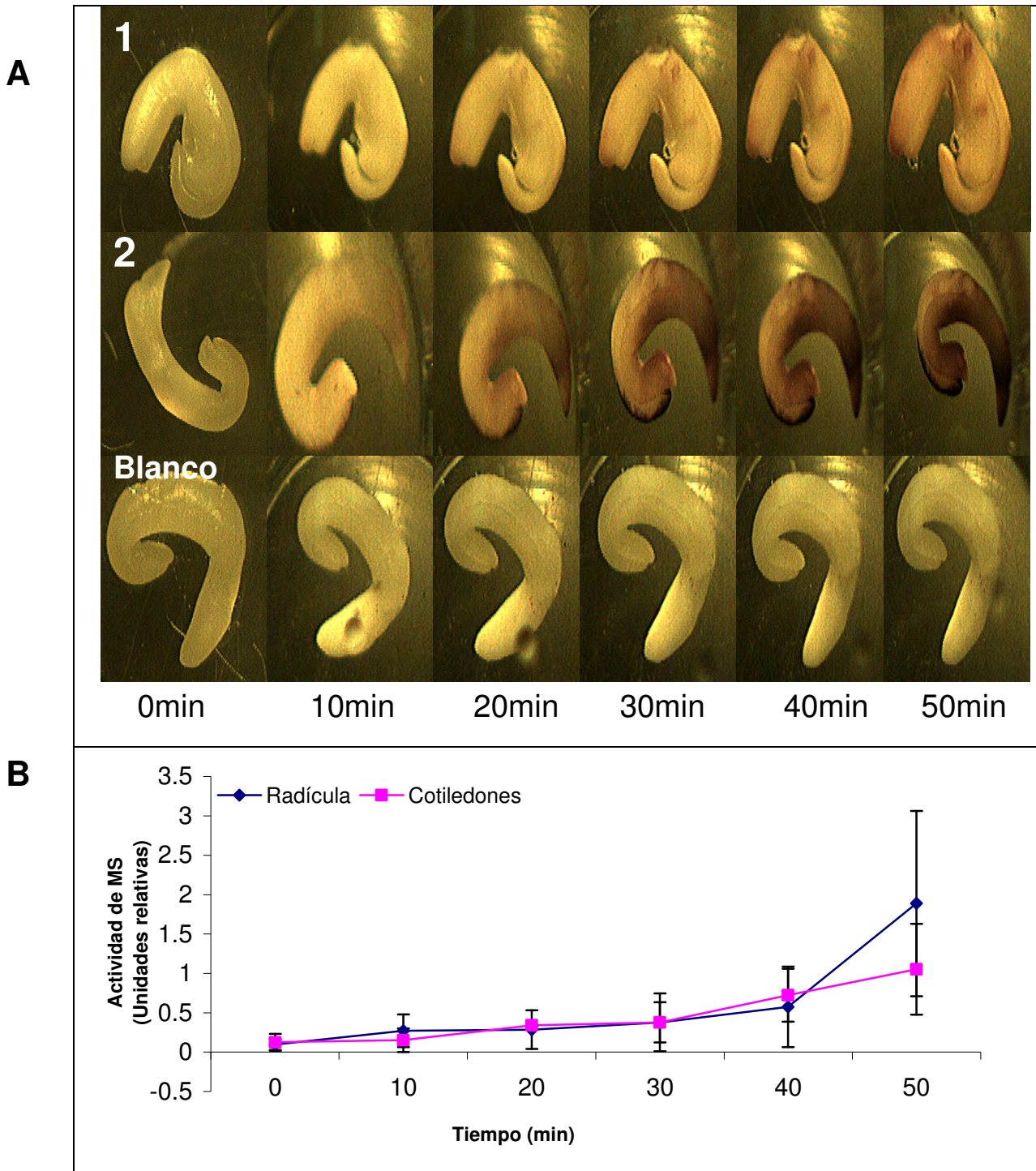


Figura 22. Detección *in situ* de la actividad de la MS en embriones de *Opuntia tomentosa* lote control 4h.

Se extrajeron embriones de semillas del lote control 4 h y se fijaron según se describe en materiales y métodos. Los embriones se colocaron en un medio de reacción para detectar la actividad de la MS y se monitoreo la aparición del color azul por 50 min. **A)** Se tomaron las fotos de los embriones y **B)** se obtuvo el curso de progreso de la reacción al determinar las intensidades de las manchas mediante el programa Motic Imágenes Plus 2.0 ML.

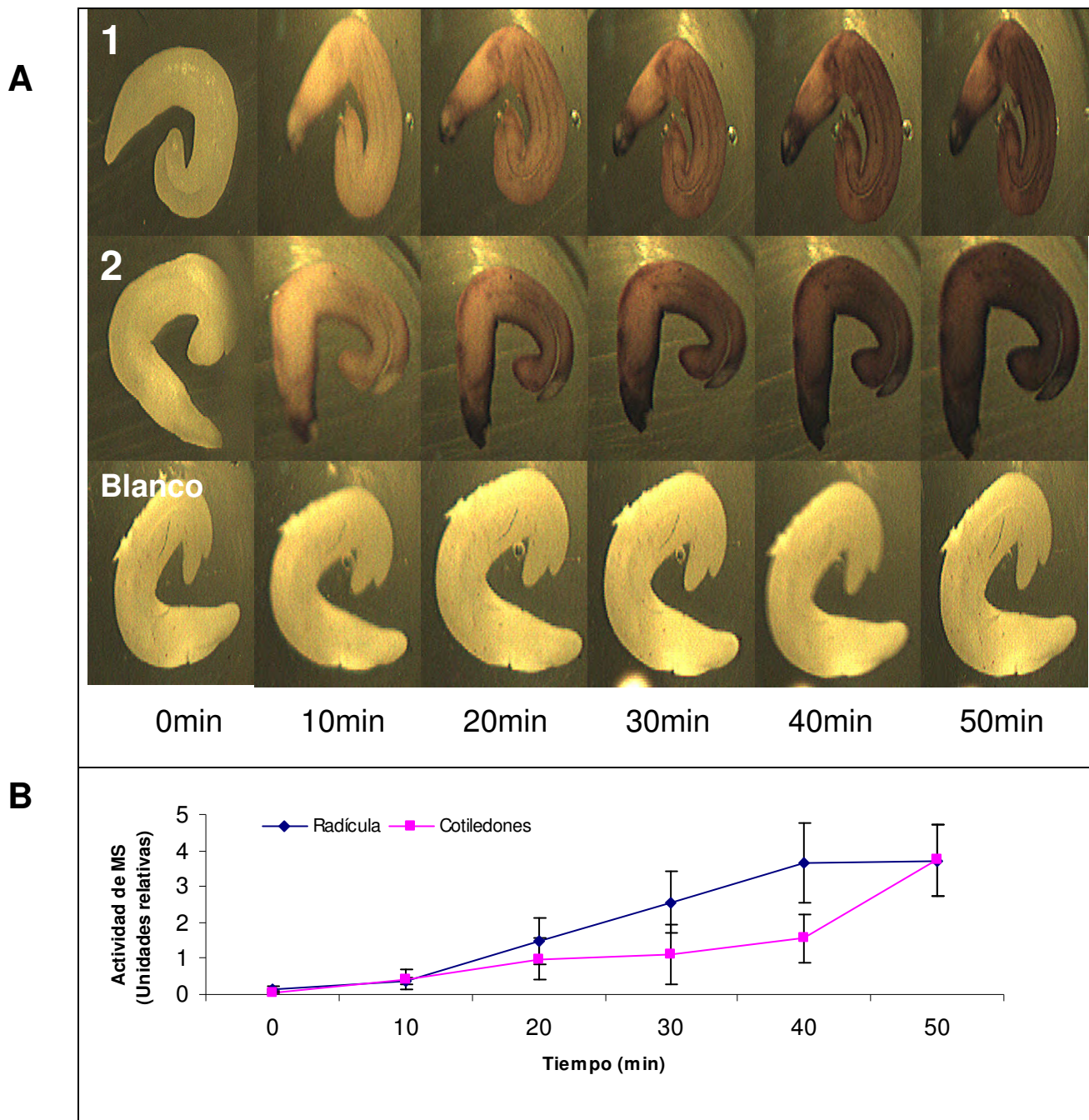
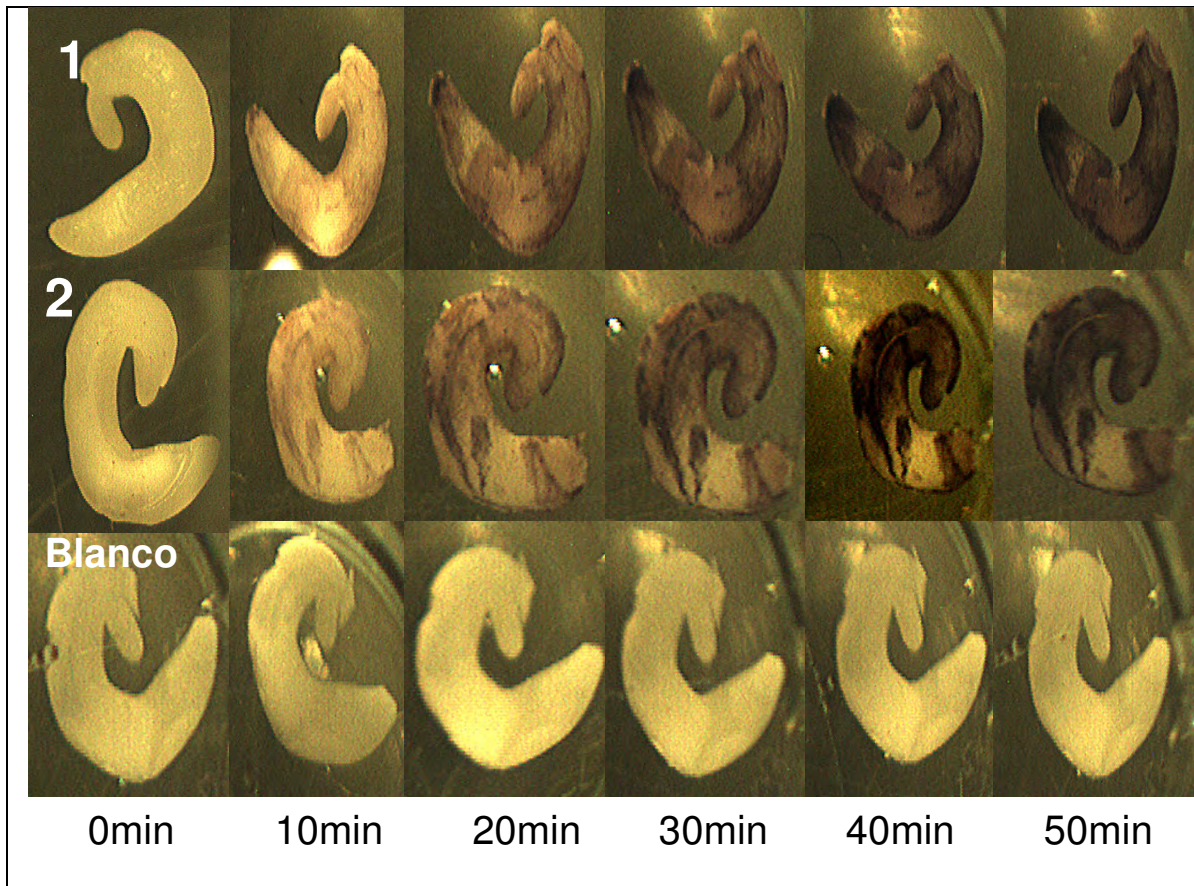


Figura 23. Detección *in situ* de la actividad de la MS en embriones de *Opuntia tomentosa* lote abierto 4h.

Se extrajeron embriones de semillas del lote abierto 4 h y se fijaron según se describe en materiales y métodos. Los embriones se colocaron en un medio de reacción para detectar la actividad de la MS y se monitoreo la aparición del color azul por 50 min. **A)** Se tomaron las fotos de los embriones y **B)** se obtuvo el curso de progreso de la reacción al determinar las intensidades de las manchas mediante el programa Motic Imágenes Plus 2.0 ML.

A



B

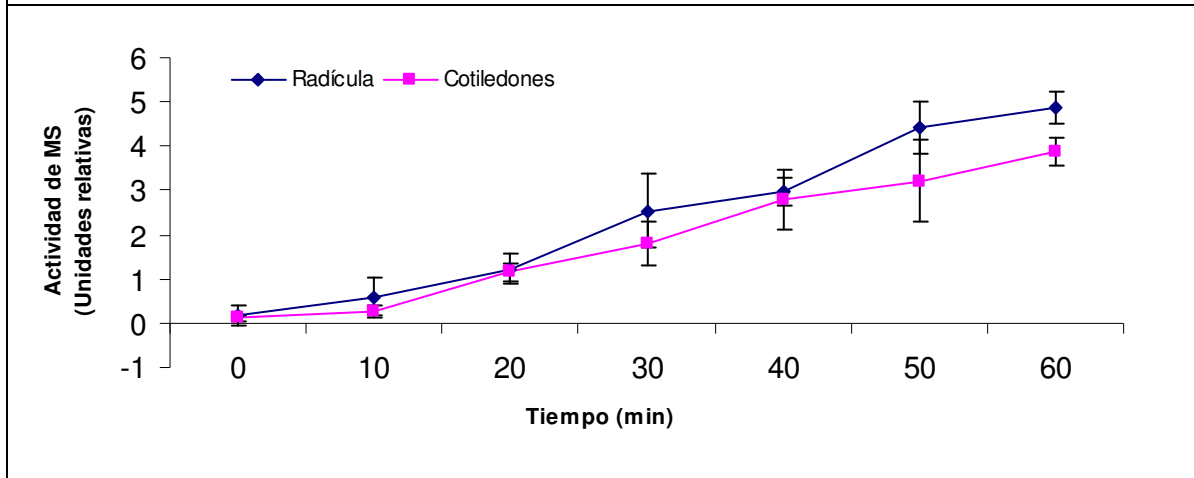
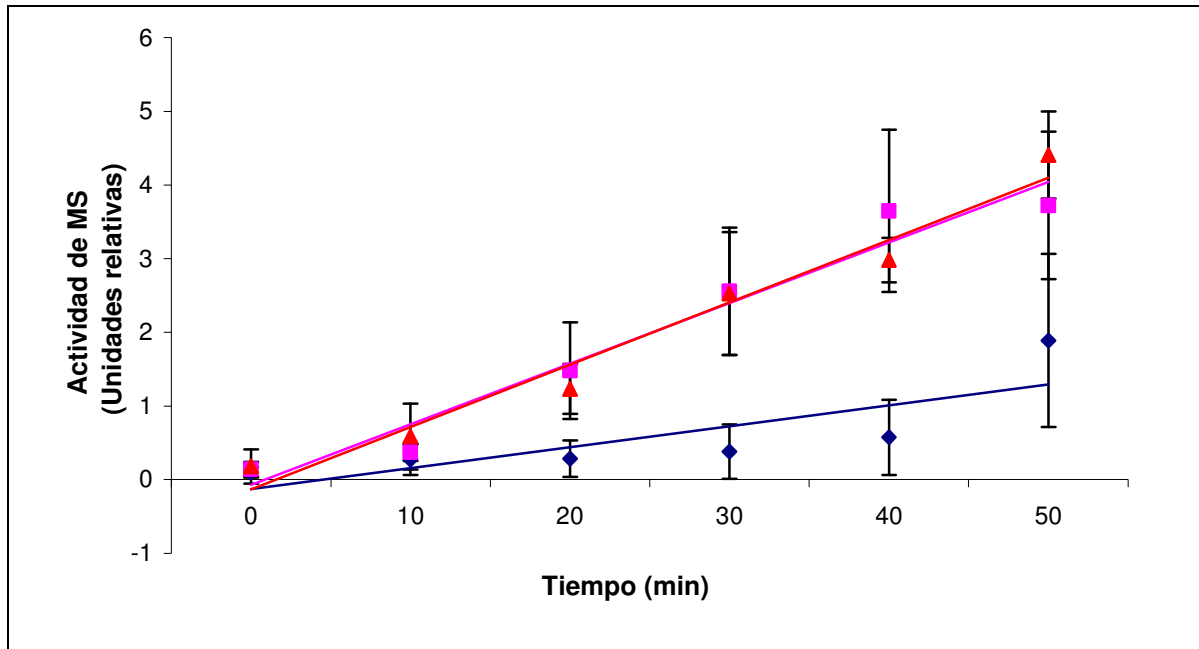


Figura 24. Detección *in situ* de la actividad de la MS en embriones de *Opuntia tomentosa* lote cerrado 4h.

Se extrajeron embriones de semillas del lote cerrado 4 h y se fijaron según se describe en materiales y métodos. Los embriones se colocaron en un medio de reacción para detectar la actividad de la MS y se monitoreo la aparición del color azul por 50 min. **A)** Se tomaron las fotos de los embriones y **B)** se obtuvo el curso de progreso de la reacción al determinar las intensidades de las manchas mediante el programa Motic Imágenes Plus 2.0 ML.

A



B

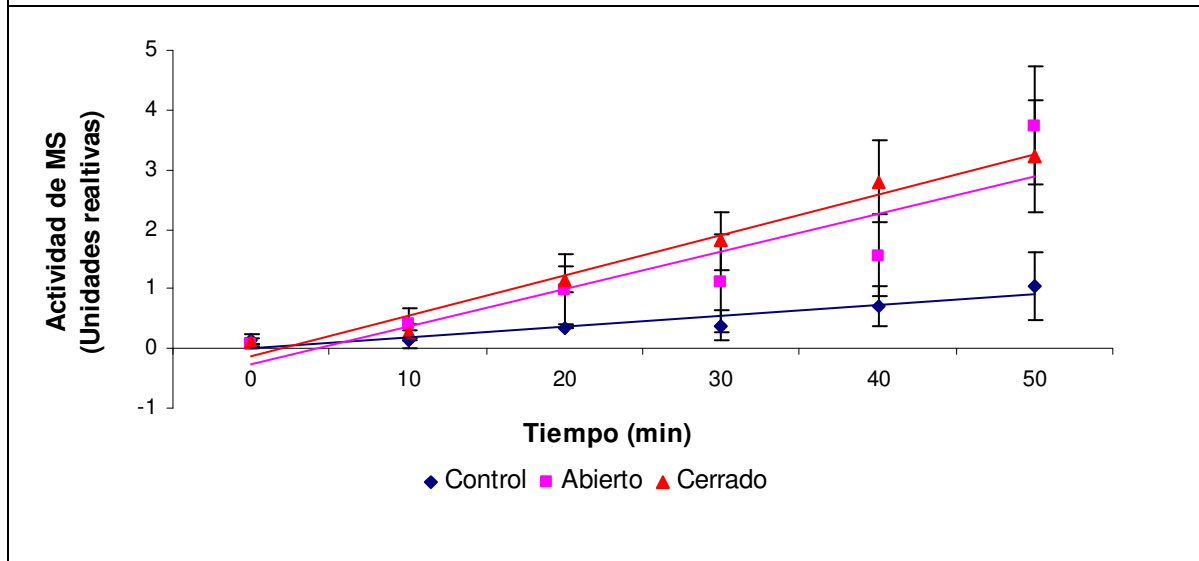


Figura 25. Curva temporal de actividad de MS de los embriones *O. tomentosa* embebidos 4h.

A. Zona radicular y B. zona de cotiledones. Se calculo la actividad de la MS a partir de los datos de regresión lineal de cada curva encontrándose que la actividad de MS para la zona de la radícula es de 0.28, 0.82 y 0.84 unidades relativas min^{-1} para el lote control, abierto y cerrado respectivamente. Y para la zona de los cotiledones es de 0.18, 0.62 y 0.67 unidades relativas min^{-1} para el lote control, abierto y cerrado respectivamente.

Las curvas comparativas de progreso de reacción muestran un perfil similar de actividad de la MS de los embriones embebidos 4h de los lotes de semillas que fueron sometidos a algún tipo de priming, tanto en la zona radicular como en la de los cotiledones.

Además, la actividad de MS es mayor en éstas que en los embriones provenientes de las semillas del lote control, 2.9 veces en la radícula y 3.7 veces en los cotiledones (Figura 34, Tabla I).

Tiempo (h)	Actividad en la zona de la Radícula (Unidades relativas min ⁻¹)			Actividad en la zona de la Cotiledones (Unidades relativas min ⁻¹)		
	Control	Abierto	Cerrado	Control	Abierto	Cerrado
0	0.09	0.59	0.48	0.64	0.88	0.41
4	0.28	0.82	0.84	0.18	0.62	0.67

Tabla I. Valores de actividad de la MS de los embriones de los tres tratamientos de semillas de *O. tomentosa* a 0 y 4 h de germinación. Los valores fueron obtenidos a partir de las pendientes de las curvas de las Figuras 30 y 34.

Comparando la actividad de la MS en los embriones sin embeber o tiempo cero y los embebidos por 4h, encontramos que en la zona radicular aumenta su actividad en los tres lotes de embriones. Sin embargo, a pesar del aumento en los embriones control, éstos no alcanzan a la actividad encontrada en los embriones que proceden de semillas con priming natural, ni la encontrada al tiempo cero ni a las 4h.

En el caso de los cotiledones la imbibición produce una disminución en la actividad los embriones control, aunque también ocurre para los embriones del tratamiento de priming en abierto. De manera similar a la zona radicular, la actividad en los cotiledones de los embriones control se reduce cuando se embeben los embriones, reducción que también se presenta en los embriones con priming abierto.

En resumen, la activación de la MS en los embriones provenientes de los lotes de semillas que pasaron por el tratamiento de priming natural, podría llevar a una movilización adelantada de lípidos y por tanto a una síntesis avanzada de sacarosa para sustentar el próximo establecimiento de la plántula.

DISCUSIÓN

El priming natural es un tratamiento que mejora de la calidad de las semillas de *Opuntia tomentosa*.

Con el crecimiento de la población mundial, se ha incrementado la necesidad de aumentar la producción de cultivos agrícolas para suministrar alimentos a la población, así como también para ayudar a mejorar las zonas agrícolas o forestales que han sido perturbadas por las diversas actividades humanas. Es por ello, que existe la necesidad de aumentar la calidad de las semillas para asegurar un alto rendimiento en el campo. Sin embargo, la calidad de las semillas es un rasgo que procede de la interacción de múltiples factores genéticos y ambientales. Algunas aproximaciones experimentales combinan los patrones genéticos clásicos de la selección de plantas con la manipulación a nivel molecular de los genes. Pero una vez que se han encontrado las plantas más vigorosas, entra un área más de investigación, “la biotecnología de semillas” (Bradford, 2006; Cantliffe, 1998).

La biotecnología de semillas aumenta el rendimiento de las semillas en el campo. Dentro de los tratamientos experimentales que se realizan para lograrlo se incluyen el priming, el cultivo de tejidos de semillas y la separación de la cubierta o testa de la semilla (Cantliffe, 1998). El priming de laboratorio es un tratamiento de hidratación-deshidratación controlada de la semilla, que permite iniciar los eventos germinativos como la reparación de membranas y el DNA, la respiración y la biosíntesis de biomoléculas, pero no se permite que concluya la germinación ya que se seca a la semilla. En el campo se sabe que esto ocurre de manera natural, las lluvias generalmente inician de manera gradual y por poco tiempo, para luego aumentar, favoreciéndose que en la primera caída de agua se hidrate la semilla y los eventos germinativos se inicien, procesos que se detienen cuando la humedad del ambiente se reduce y a la segunda o tercera caída de agua los eventos metabólicos continúan desde donde se quedaron la primera o segunda vez llevando a una germinación más rápida (Dubrosky, 1996).

En los lotes de semillas que fueron sujetos a los tratamientos de priming natural, encontramos que efectivamente la germinación se adelantó 4 horas, respecto al tiempo en el que el lote control germinó. Un dato adicional que confirmó el adelanto en la actividad germinativa de los lotes que pasaron por el tratamiento con priming fue que al tiempo cero ya respiraban (Figura 11). Se removió la testa de las semillas con priming y encontramos que la radícula se encontraba elongada y 4 h más tarde es capaz de asomarse a través de la testa (Figura 12). Además, encontramos que las plántulas que provenían del tratamiento de priming eran más vigorosas que las control (datos no mostrados). Todo lo anterior corrobora que el tratamiento de priming natural adelanta la germinación y favorece el crecimiento de la plántula y la prepara para las condiciones adversas del ambiente, sobre todo al producir hojas más rápidamente así como presentar un tallo más grueso, efectos que se han reportado que el priming de laboratorio induce en diferentes especies de plantas de importancia agrícola como maíz, arroz y garbanzo (Cantliffe, 1998; Harris *et al.*, 1999).

El priming natural ofrece aún más ventajas que el priming de laboratorio, ya que las condiciones en las que la hidratación ocurre son más cercanas al medio en el que las plántulas se desarrollaran como condiciones cambiantes de temperatura, tiempo y calidad de luz, la presencia de microorganismos en el suelo entre otros. El priming natural es poco entendido a nivel molecular, los genes, enzimas, componentes de señalización se desconocen pero su entendimiento ayudará a producir estrategias para mejorar la calidad de semillas. Es por ello, que en el presente trabajo se estudio una especie que se enfrenta a periodos irregulares de lluvias y que el priming mejora su germinación y crecimiento como plántula, la *Opuntia tomentosa*. Debido a que consideramos que la movilización de las reservas es un paso inicial e importante para sostener la reparación de las membranas, DNA y la síntesis de ATP al inicio de la germinación, se determinaron algunos metabolitos como los carbohidratos y los lípidos.

Cambios en el metabolismo de carbono durante el priming natural.

La disminución en el contenido de almidón (Figura 16), fructosa (Figura 14) y triacilgliceroles (Figura 16), en las semillas que fueron sometidas al priming natural, sugiere que ya se iniciaron los eventos metabólicos de la germinación. Degradación de almidón para aumentar la disponibilidad de glucosa, incremento en el uso de carbohidratos solubles como fructosa y también el uso de los triacilgliceroles para diferentes vías metabólicas y favorecer el crecimiento del embrión. A pesar de no encontrar cambios en el contenido de sacarosa en los tres lotes examinados (Figura 15), los datos de contenido de fructosa, así como de lípidos sugieren que el metabolismo de la sacarosa se encuentra modificado, ya que la sacarosa es una fuente fácilmente asimilable y que además de producir fructosa como uno de sus productos, es sintetizada a través de los lípidos de reserva.

Adicionalmente, en la literatura se encuentran datos que muestran que tanto el osmopriming como el hidropriming son capaces de modificar el contenido de almidón, carbohidratos solubles y también la actividad de enzimas que directamente usan a la sacarosa, como las invertasas y la sacarosa sintetasa (Kaur *et al.*, 2002; Gill *et al.*, 2002). En las semillas de garbanzo el priming acelera el crecimiento de la semilla entre 3 a 4 veces más que las control. Adicionalmente aumenta la actividad de las invertasas ácidas y alcalinas, así como también de las sacarosa fosfato sintetasa, llevando a un cambio en el índice sacarosa/hexosas. Los autores proponen que la reducción en el contenido de sacarosa en las plántulas obtenidas de las semillas que fueron sometidas a priming, incrementa la fuerza de demanda de más azúcares para potenciar o incrementar el crecimiento de la plántula. En el caso de *Opuntia* sólo observamos reducción en el contenido de almidón y en el de fructosa, ambos carbohidratos serían fuente de carbono

para el embrión en crecimiento, pero no son los únicos que pueden ser utilizados, la otra fuente importante como ya se mencionó son los lípidos y la sacarosa.

No se encontraron diferencias en el contenido de sacarosa entre los tres lotes examinados, sin embargo, la actividad de las invertasas ácidas sí se modificó. Las invertasas ácidas son enzimas que usan como sustrato sacarosa y producen glucosa y fructosa, funcionan en compartimentos con pHs ácidos como la vacuola y la pared celular (Sturm, 1999). Las semillas que pasaron por los tratamientos de priming presentaron una actividad mayor de invertasas ácidas tanto en la radícula como en la zona de los cotiledones comparadas con las semillas del lote control (Figuras 24-25), similar a lo encontrado en las semillas de garbanzo (Kaur *et al.*, 2002). Metabolismo que podría incrementar la disponibilidad de hexosas para el embrión en crecimiento.

La explicación del porque no se encontraron diferencias en los contenidos de sacarosa, a pesar de sí haber un incremento en la actividad de las enzimas que hidrolizan al disacárido, está en que su síntesis se hubiera incrementado, por lo inicialmente se analizaron los contenidos de lípidos en los tres lotes de semillas. Los contenidos totales de lípidos sólo nos indicaron que al tiempo cero las semillas con priming se redujeron pobremente, pero al analizar algunos lípidos de este extracto se encontró que efectivamente los triacilgliceroles habían disminuido en los lotes de semillas que fueron tratados con el priming natural (Figuras 19 y 17).

La degradación de triacilgliceroles es un proceso que ocurre desde el inicio de la germinación y en esa etapa se considera que cumplen un papel eminentemente respiratorio, es decir el glicerol será catabolizado en la glicólisis, mientras que los ácidos grasos al convertirse a acetil-CoA por la β -oxidación, serán metabolitos del ciclo de Krebs (Eastmond y Graham, 2001). Aunque una parte de los triacilgliceroles tienen que usarse como fuente de nuevos componentes membranales y así restituir aquellos que se hubieran dañado, debido a la oxidación o degradación ocurrida durante el proceso de almacenamiento de la semilla o el de su hidratación. En las semillas con priming se observó que

efectivamente los TGA se encuentran disminuidos respecto a la semilla control seca (Figura 19; 47 y 38% abierto y cerrado respectivamente), aunque también se observó que dependiendo del tipo de priming natural realizado, los cambios metabólicos y estructurales en la semilla son distintos.

Efecto del priming natural abierto en el metabolismo de carbono de las semillas de *Opuntia tomentosa*.

El priming en abierto produce un alargamiento celular mayor al encontrado en las semillas que pasaron por el priming en cerrado (Figura 12). A nivel molecular cuando el priming natural fue en una zona abierta hay una mayor degradación de TAG y al pasar por 4 h de imbibición continúa la degradación, lo que lleva a un aumento importante en la concentración de DAG y también a un incremento de 386% en la PE, componente importante en las membranas (Figuras 19 y 20). Se conoce que la degradación inicial de lípidos no es necesaria para que la germinación ocurra, ya que la sacarosa es capaz de mantener el proceso si se reduce la tasa de utilización de lípidos, sin embargo para el establecimiento de la plántula es requisito indispensable iniciar y mantener la concentración de sacarosa a través del funcionamiento de la degradación de lípidos, la β -oxidación, el ciclo del glioxilato y la gluconeogénesis. En particular, se ha descrito en la literatura que mutantes de *Arabidopsis thaliana* en las enzimas isocitrato liasa o malato sintasa, presentan una reducción en su crecimiento post-germinativo, pero que es aliviado si se añade al medio de crecimiento sacarosa (Eastmond *et al.*, 2000). En el caso particular de *Opuntia tomentosa* encontramos que el priming natural en abierto incrementa 6 veces la actividad de la MS en la radícula respecto a la semilla seca control y sólo 1.4 veces en la zona de los cotiledones. Al embeber las semillas del lote control por 4 h producen un aumento de la actividad de la MS, pero que es apenas del 50% y 20% de la actividad que presentan las semillas del tratamiento en priming en abierto a las 0 h en la radícula y el cotiledón, respectivamente. Lo que indica que el ciclo del glioxilato se activa durante el priming y probablemente acerca a la plántula a su desarrollo autotrófico.

A pesar de que el ciclo del glioxilato se encuentra activo no observamos un incremento en la concentración de sacarosa (Figura 15), lo que indicaba que la hidrólisis del disacárido ocurría. Como se menciona la actividad de invertasas ácidas fue mayor, tanto en la zona radicular como en la de los cotiledones en las semillas con priming. Lo que indica que a pesar de que las semillas adelantan sus procesos metabólicos, tienen a mantener la homeostasis.

Efecto del priming natural cerrado en el metabolismo de carbono de las semillas de *Opuntia tomentosa*.

Respecto al priming natural en cerrado, encontramos que también se encuentra alterado el metabolismo de lípidos, el contenido de TAG es menor (60% menos) que en el lote control, sin embargo cuando ambos lotes de semillas se embeben llegan a un contenido de TAG similar (184 y 203, control y cerrado, respectivamente; Figura 19). No obstante, las semillas con priming natural en cerrado, han degradado más DAG y ácido oleico, lo que sugiere que hay una formación mayor de sacarosa o bien de membranas.

Al medir la actividad de la MS, encontramos que efectivamente hay un incremento de 5.3 y 3 veces en la actividad de la enzima en la radícula en la semilla seca y a las 4 h de imbibición, respectivamente (Figuras 29 y 33). Lo cual confirma que los lípidos se están movilizándose hacia la formación de sacarosa en el tejido que está requiriendo de un aporte de nutrientes alto, la radícula. No obstante, que el priming en cerrado ocasiona que las semillas se adelanten en la germinación respecto a las semillas del lote control, lo hacen de manera diferente y menor que el lote de semillas que paso por el priming en abierto, ya que su crecimiento radicular es menor al de éstas y como vimos el recambio de lípidos y la síntesis de sacarosa es distinta (Figura 21). Lo anterior podría explicarse porque al estar las semillas enterradas en una zona que se encuentra sujeta a menos variaciones de temperatura, debido a que se encuentra cubierta por el dosel de los árboles, el tiempo de hidratación de la semilla se prolonga, pero se realiza a una temperatura

menor que las semillas que pasaron por el tratamiento de priming en abierto. En maíz se ha encontrado que el priming llevado a cabo a temperaturas bajas (10°C) disminuye los procesos de oxidación de los lípidos, medidos como niveles de malondialdehído, H₂O₂ y productos de la reacción de Maillard. Otro de los beneficios de las temperaturas bajas durante el priming son la de prolongar su vida en anaquel (Chiu *et al.*, 1996).

En resumen, el metabolismo de carbono se adelanto en las semillas que pasaron por los tratamientos de priming natural, se adelanto la movilización de almidón, fructosa, TAG y sacarosa, pero también se realizó la biosíntesis o reparación de membranas, así como la síntesis de sacarosa. El adelanto en la movilización de sacarosa se confirmo al medir la actividad de las invertasas ácidas. Tanto la zona radicular como la de los cotiledones aumento su actividad de invertasas ácidas, pero la primera más, lo que indica que la radícula necesita de un gran aporte de nutrientes para su elongación y posterior crecimiento. Sin embargo, también la biosíntesis de sacarosa se encuentra adelantada en las radículas aunque también en los cotiledones de las semillas que pasaron por los tratamientos de priming, lo que provee la molécula adecuada para el transporte de carbono célula a célula y el carbono necesario para el crecimiento del tejido embrionario, probablemente acercando en tiempo al embrión y la próxima plántula a su establecimiento como organismo autotrófico, respecto a lo que ocurre en el embrión que no recibió el tratamiento de priming. Es probable que el tipo de priming que se dé afecte de manera diferencial a la semilla a largo plazo, ya que la radícula en el caso del tratamiento de priming en cerrado es menor que la del priming en abierto, pero también a nivel molecular los eventos se encuentran más retardados cuando el priming fue en una zona cerrado. Con los resultados hasta el momento no podemos plantear si efectivamente hubo un beneficio adicional como el avance en los sistemas antioxidantes, pero sería interesante medirlos y determinar si las semillas de priming en cerrado permanecen viables por más tiempo en el almacén.

CONCLUSIONES

- El tratamiento de priming natural en semillas de *O. tomentosa* adelanta los procesos germinativos y favorece el crecimiento de la plántula.
- El metabolismo de carbono se adelantó en la semillas que pasaron por el priming natural, representado por la movilización del material de reserva como el almidón, la fructosa y los triacilgliceroles.
- Lo anterior sugería una alteración en el metabolismo de carbono, pese a que la concentración de sacarosa no se vio alterada. Sin embargo, la actividad de las invertasas ácidas aumento durante la germinación en las semillas sometidas al tratamiento de priming natural, tanto en la radícula como en los cotiledones, aunque mayormente en la radícula.
- Alta movilización de sacarosa sin cambio en el contenido total de sacarosa sugería la utilización de lípidos para la síntesis del disacárido. Se observó que los lípidos se movilaron durante el tratamiento de priming natural, esta movilización se ve afectada respecto al lugar donde se llevó a cabo el priming natural presentando dos comportamientos, mayor movilización en el priming abierto y menor en el cerrado.
- El efecto de priming natural produce una disminución en el contenido de triacilgliceroles en la semilla seca, así como un aumento en los fosfolípidos.
- La actividad de la Malato sintasa, participante del ciclo del glioxilato e indicativo de aumento en la síntesis de sacarosa, se incrementó en las semillas que fueron sometidas a priming natural, aunque más en el priming natural en abierto, pero sobre todo en la zona de la radícula, esto para sustentar la próxima salida de la radícula y el establecimiento en la planta.

PERSPECTIVAS.

- Para determinar más claramente que hay síntesis de sacarosa se podrían determinar la actividad de la enzima Sacarosa P sintasa en semillas de *O. tomentosa* a 0 y 4 h de imbibición.
- También sería interesante medir alguna enzima involucrada en la hidrólisis del almidón, ya que vimos que éste disminuye durante el priming, ADP glucopirofosforilasa.
- Con la finalidad de ver si las semillas de *O. tomentosa* que fueron sometidas a priming están adelantadas en su capacidad fotosintética con respecto a las del control, se mediría la actividad de la enzima málica dependiente de NAD⁺ y NADP⁺ en semillas de *O. tomentosa* a 0 y 4h.
- Evaluar si los cambios en el metabolismo de carbono de las semillas sometidas a priming, influyen en la resistencia que se sabe tienen las plantas a condiciones ambientales adversas.

REFERENCIAS.

- Armenta S. 2007. Efecto del Priming natural en la movilización de carbohidratos en la germinación de semillas de *Dodonea viscosa*: papel de la invertasas ácidas. Tesis para obtener el título de Químico en Alimentos.
- Baud S Graham A. 2006. A spatiotemporal analysis of enzymatic activities associated with carbon metabolism in wild-type and mutant embryos of *Arabidopsis* using *in situ* histochemistry. *The plant journal* 46, 155-169 pp.
- Bewley JD, Black M. 1994. *Seeds. Physiology of Development and Germination*. 2nd edition. Plenum Press. N.Y. USA. 445pp.
- Bewley JD. 2001. Plant storage products (carbohydrates, oils and proteins). *Enc. Life Sci.* Nature Publishing Group, pp 1-8
- Bove J, Jullien M, Grappin P. 2001. Functional genomics in the study of seed germination. *Genome Biol.* 3:reviews1002.1-1002.5
- Bradford KJ. 2004. Germination: Imbibition, activation and reserve mobilization. In *Seed Production and quality*. 85-94pp.
- Bradford KJ. 2006. Methods to maintain genetic purity of seed stocks. Genetic engineering producer fact sheet 2. *Agricultural biotechnology in California series publication 8189*. Regents of the University of California, Division of Agriculture and Natural Resources. Versión electrónica <http://anrcatalog.ucdavis.edu>.
- Cantliffe DJ. 1998. Seed germination for transplants. *Hort Technol* 8, 1-5. Chiu KY, Chen CL, Sung. 2002. Effect of priming temperature on storability or primed sh-2 sweet corn seed. *Crop Sci* 42, 1996-2003.

- Dubrovsky J. 1996. Seed hydration memory in Sonoran Desert cacti and its ecological implication. *American Journal of Botany* 624-632 pp.
- Eastmond PJ, Germain V, Lange PR, Bryce JH, Smith SM, Graham IA. 2000. Postgerminative growth and lipid catabolism in oilseeds lacking the glyoxylate cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 5669-5674.
- Eastmond PJ, Graham IA. 2001. Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. *Trends Plant Sci.* 6: 72-78.
- Gill PK, Sharma AD, Singh P, Singh-Bhullar S. 2002. osmotic stress-induced changes in germination, growth and soluble sugar content of sorghum bicolor (L.) moench seeds. *Bulg J Plant Physiol* 28, 12-25.
- González-Zertuche L, Vázquez-Yanes C, Gamboa A, Sánchez-Coronado ME, Aguilera P, Orozco-Segovia A. 2001. Natural priming of *Wigandia urens* sedes during burial: Effects on germination, growth and protein expression. *Seed Sci. Res.* 11: 27-34.
- Harris D, Joshi A, Khan PA, Gothkar P, Sondhi PS. 1999. On farm seed priming in semi-arid culture: development and evaluation in maize, rice and chickpea in India using participatory methods. *Exp Agr* 35, 15-29.
- Hegarty TW. 1978. The physiology of seed hydration and dehydration, and the relation between water stress and the control of germination: a review. *Plant Cell Env.* 1: 101-119.
- Kaur S, Gupta AK, Kaur N. 2002. Effect of osmo- and hydropriming of chickpea seeds on seedling growth and carbohydrate metabolism under water deficit stress. *Plant Growth Reg* 37, 17-22.

- Martínez-Marcelo VH. 2008. Expresión de la actividad de las invertasas ácidas en la germinación de tejido embrionario de maíz en carbohidratos metabolizables y su relación con el contenido de carbohidratos. Tesis para obtener el título de Químico en Alimentos.
- Ramírez-Palma T. 2007. El estrés hídrico altera el reparto de carbono en tejidos fuente y demanda de plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum*). Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM.
- Reynolds Stephen G, Arias-Jiménez E. El nopal (*Opuntia* spp.) como forraje. En estudio FAO producción y protección vegetal 169 ISSN 1014-1227 ISBN 92-5-304705-4 Editado por Mondragón-Jacobo C, Pérez-González S. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Roma 2003
- Roitsch T, González MC. 2004. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. Trends Plant Sci. 9: 606-613.
- Srivastava LM. 2002. Plant Growth and development. Hormones and environment. Academic Press, San Diego, CA, Estados Unidos. 447-464, 503-519 pp.
- Stephen G.R. Arias-Jiménez E. 2003. El nopal (*Opuntia ssp.*) como forraje. En estudio FAO producción y protección vegetal 169 ISSN 1014-1227 ISBN 92-5-304705-4. organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Roma.
- Sturm A. 1999. Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. Plant Physiol 121: 1-7